

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  C12N 15/55, 15/82, A01H 5/00, A23K 1/165, C08B 30/00, C12P 19/04		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/05785</b>  (43) Date de publication internationale: 12 février 1998 (12.02.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01443</p> <p>(22) Date de dépôt international: 1er août 1997 (01.08.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/09734 1er août 1996 (01.08.96) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOCEM [FR/FR]; Campus Universitaire des Cézeaux, 24, avenue des Landais, F-63170 Aubière (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MAUGENEST, Sébastien [FR/FR]; 140, rue Mouffetard, F-75005 Paris (FR). LESCURE, Anne-Marie [FR/FR]; 13, rue des Bourdonnais, F-78000 Versailles (FR). PEREZ, Pascual [FR/FR]; Chemin de la Pradelle, Varennes, F-63450 Chanonat (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régime-beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Publiée</b> Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</p>	
<p>(54) Title: PLANT PHYTASES AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS</p> <p>(54) Titre: PHYTASES DE PLANTES ET APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns plant phytases, in particular maize phytases, the genome DNA and complementary DNA sequences, as well as the transgenic plants or plant organs obtained from these sequences.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne des phytases de plantes, notamment des phytases de maïs, les séquences d'ADN génomiques et d'ADN complémentaires, ainsi que les plantes ou organes végétaux transgéniques obtenus à partir de ces séquences.</p>			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

5

## PHYTASES DE PLANTES ET APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES

La présente invention concerne les phytases de plantes, ainsi que leurs applications biotechnologiques.

La présente invention concerne également un ou plusieurs fragment(s) d'acide nucléique codant pour une phytase de céréales, plus particulièrement pour la phytase du maïs et un ou plusieurs fragment(s) caractérisé(s) en ce qu'il s'agit de fragments d'ADNc ou d'ADN génomique.

En outre, la présente invention concerne un fragment d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence de nucléotides telle que montrée dans l'identificateur de séquences (SEQ ID) n° 1 codant pour une activité phytase ou tout ou partie des séquences génomiques Phyt I ou Phyt II telles que définies ci-après.

Enfin, la présente invention concerne un fragment caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence codante allant du nucléotide n° 32 à 1192 de SEQ ID n° 1.

La plus grande partie du phosphate présent dans les plantes, notamment dans les semences, est sous la forme de phytine, sel complexe de myo-inositol-acide hexaphosphorique (acide phytique). La phytine constitue une réserve de phosphore, d'hydrates de carbone et de divers cations. Ainsi dans les grains de maïs, le phosphore du phytate représente jusqu'à 88 % du phosphore total (O'Dell et al., 1972). La mobilisation de la phytine est due aux phytases, type spécial de phosphatases, capables d'hydrolyser le phosphate à partir de l'acide phytique ainsi qu'à partir d'autres substrats phosphorylés (Gibson et Ullah, 1990). On a signalé des activités de phytase dans une large gamme de semences. Généralement, on peut détecter de très faibles quantités d'activité endogène dans les semences non germées, sauf pour le blé, le seigle et leur hybride tritcale (Pointillard, 1994). Une forte augmentation d'activité concomitante avec une diminution de la phytine apparaît au début de la germination. On ne dispose que de peu d'informations sur les mécanismes qui régulent le niveau d'activité de la phytase dans les semences.

L'intérêt qui existe pour la phytase vient de l'industrie alimentaire. La phytine, ou acide phytique, provenant des farines de semences sèches, n'est pas digérée par les animaux monogastriques en l'absence de phytase exogène et est donc excrétée telle quelle, contribuant ainsi à la pollution par le phosphate des zones

5 d'élevages intensifs. De plus, elle est considérée comme un facteur antinutritionnel car elle chélate les minéraux essentiels tels que Ca, Fe et Zn lesquels, de ce fait, ne sont pas absorbés par les animaux monogastriques (Graf, 1986). Des recherches poussées ont été entreprises afin de permettre la digestion du phytate par addition de phytases exogènes à de telles farines. Les phytases végétales sont normalement produites en quantités insuffisantes pour leur utilisation dans les processus industriels.  
10 On peut obtenir les phytases extracellulaires produites par le champignon *Aspergillus niger* en grandes quantités et on a trouvé qu'elles conviennent bien pour une utilisation en tant qu'additif alimentaire pour les animaux (Nair et Duvnjak, 1990 ; Simons et al., 1990). On a séquencé (van Hartingsveldt et al., 1993 ; Ehrlich et al., 1993) des ADNc codant pour deux phytases différentes, Phy A et Phy B d'*Aspergillus niger*. Récemment, on a obtenu des plants de tabac transgéniques exprimant de façon ectopique la phytase fongique Phy A (Pen et al., 1993 ; Verwoerd et al., 1995).

20 Avant la présente invention, on n'avait pas pu obtenir d'ADNc codant pour une phytase végétale et les mécanismes moléculaires qui commandent la régulation de l'expression de la phytase au cours de la formation des semences ou de la germination n'étaient pas connus. Etant donné l'importance de l'acide phytique comme forme de stockage du phosphate dans les grains de maïs, le clonage d'un gène de phytase végétal et une meilleure connaissance de ces mécanismes étaient donc très recherchés

25 Au cours de la germination, les plants de semis de maïs expriment une phytase capable d'hydrolyser la grande quantité de phytine emmagasinée dans le grain sec. Des études antérieures ont permis de purifier et de caractériser cette enzyme (Labouré et al., Biochem. J., 1993, 295, 413 - 419).

30 Dans ce travail antérieur (Labouré et al., 1993), on a décrit la caractérisation d'une phytase qui s'accumule dans les jeunes plants de maïs au cours des premiers jours de la germination. La protéine native apparaît sous la forme d'un homodimère constitué de deux sous-unités à 38kDa. Cette enzyme présente la plupart des caractéristiques enzymatiques d'autres phytases acides végétales.

35 Selon la présente invention on a isolé et caractérisé un ADNc codant pour la sous-unité de cette phytase de semence de maïs. Ceci constitue la première séquence nucléotidique obtenue pour une phytase végétale.

Selon la présente invention, on a utilisé un polysérum de lapin dirigé contre la phytase de maïs purifiée jusqu'à homogénéisation pour cibler une

5 bibliothèque d'expression d'ADNc de jeunes plants de maïs. On a pu isoler plusieurs clones positifs contenant un insert d'environ 1400 pb. On a établi la séquence nucléotidique de l'insert d'un de ces clones. Cet ADNc, appelé phy S11, contient 1335 pb avec un cadre ouvert de lecture pour 387 aa. On a établi les résidus N-terminaux (23 aa) de la phytase purifiée. On trouve ces résidus dans les positions 19 - 10 41 de la séquence d'aa pour laquelle code phy S11. Ceci confirme que cet ADNc code pour la phytase du maïs.

15 La présente invention fournit donc la première séquence codant pour une phytase végétale. Ehrlich et Montalban (1992) et Gellatly et Lefebvre (1990) ont mentionné des essais de clonage et séquençage d'ADNc de phytase respectivement provenant de semences de soja et de tubercules de pommes de terre, mais les séquences correspondantes n'ont jamais été publiées, de sorte que la comparaison de l'ADNc du maïs avec d'autres ADNc de phytase végétale n'est pas possible.

20 Les seules séquences nucléotidiques disponibles correspondent aux phytases provenant d'*Aspergillus niger* (van Hartingsveldt et al., 1993 ; Ehrlich et al., 1993). Les phytases de microorganismes appartiennent aux phytases de classe 3 qui commencent par retirer l'orthophosphate de la position 3 de l'acide phytique, tandis que les phytases végétales appartiennent aux phytases de classe 6 qui catalysent l'enlèvement de l'orthophosphate de la position 6. Des comparaisons antérieures entre les phytases purifiées d'*Aspergillus ficuum* et de soja dues à Gibson et Ullah (1990) montrent que peu de caractéristiques physiques au niveau protéique (taille moléculaire, composition en acides aminés, séquences d'aa partielles) semblent être communes aux deux enzymes. En accord avec ces comptes-rendus antérieurs, la comparaison entre la séquence d'aa totale pour laquelle code l'ADNc phy S11 et celle de phy A d'*Aspergillus niger* ne montre pas beaucoup de similitudes significatives. 25 On trouve un recouvrement de 33 aa avec une homologie de 84 %. Cette région à 33 aa des deux phytases d'*Aspergillus* Phy A et Phy B contient le motif consensus RHGxRxP trouvé dans plusieurs phosphatases acides et dont on pense qu'il s'agit de la région accepteur de phosphate (Piddington et al., 1993). Les deux Arg et les résidus His du consensus sont conservés dans la séquence du maïs. Une mutagénèse dirigée 30 sur la phosphatase acide périplasmique de *E.coli* (EcAP) a montré que le remplacement de ces résidus Arg et His dans le motif conservé aboutit à une forte réduction de l'activité enzymatique (Ostanin et al., 1992). Par conséquent, la présence 35 de ces résidus dans la séquence de la phytase du maïs peut être en relation avec

5 l'activité de phosphatase. On remarque que le motif consensus est généralement localisé à l'extrémité N-terminale des phosphatases acides de microorganisme (position 81 - 87 dans Phy A d'*Aspergillus*), tandis qu'il est situé entre les positions 10 204 et 210 dans la séquence du maïs. Ces comparaisons confirment que les phytases végétales sont très différentes des phytases d'*Aspergillus* bien caractérisées.

10 En outre :

15 a) les deux phytases d'*Aspergillus* sont excrétées dans le milieu extérieur lors d'une carence en phosphate. Elles possèdent un peptide signal et sont fortement glycosylées. Or, les phytases de plantes sont destinées à hydrolyser la phytine contenue dans la plante. L'analyse de la séquence de la phytase de maïs ne révèle pas de peptide signal évident. Aucun résidu glycosylé n'a été détecté par réaction avec le réactif de Schiff ni avec la phytase de maïs, ni avec la phytase de soja purifiée antérieurement par Gibson et Ullah (1990). Aucun motif consensus d'attachement de résidu glycosylé n'est observé sur la séquence protéique de la phytase de maïs ;

20 b) le profil d'hydropathie de Phy S11 révèle la présence dans la 25 région COOH-terminale d'une séquence de 65 aa fortement hydrophobe. Cette séquence peut servir d'ancrage de l'enzyme aux corps protéiques, organites pourvus d'une membrane et dans lesquels la phytine est localisée sous forme de globoïdes. Des expériences déjà anciennes, réalisées sur le pollen (Baldi et al., 1988, Plant Science, 56, 137-147), ont montré que les phytases acides étaient attachées à la membrane des corps protéiques dont elles constituent "un composant externe".

30 L'analyse de la séquence protéique de Phy S11 indique donc que cette phytase de plante est très différente des phytases de champignons seules caractérisées jusqu'ici, et vraisemblablement mieux adaptée à digérer le phytate endogène des graines.

35 La présente invention a donc pour objet les fragments d'acide nucléique isolé codant pour une enzyme phytase de plante

40 Plus particulièrement, l'enzyme est la phytase de céréale, telle que, maïs, blé, orge, seigle, triticale.

45 Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention a pour objet un fragment d'acide nucléique isolé codant pour une activité phytase, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence de nucléotides telle que montrée dans l'identificateur de séquence n° 1, ou tout ou partie d'une séquence homologue à celle montrée dans l'identificateur de séquence n° 1, ou tout ou partie d'une séquence

complémentaire de ladite séquence de l'identificateur de séquence n° 1 ou d'une séquence homologue.

Par "fragment d'acide nucléique", on entend ici une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN. Ces termes sont définis dans tous les ouvrages de base de biologie moléculaire. Préférentiellement, un fragment d'acide nucléique selon l'invention est un fragment d'ADN double brin.

Le terme "partie" désigne notamment un fragment d'au moins 20 nucléotides, en particulier d'au moins 100 nucléotides, par exemple d'au moins 500 nucléotides et avantageusement d'au moins 1000 nucléotides identiques à une portion d'une longueur équivalente de la séquence nucléotidique concernée.

Le terme "homologue" fait référence à tout acide nucléique présentant une ou plusieurs modification(s) de séquence par rapport à tout ou partie de la séquence montrée dans SEQ ID n° 1, et codant pour un enzyme ayant l'activité mentionnée ci-dessus.

Ces modifications peuvent être obtenues par mutation, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotide(s) par rapport à la séquence native. Elles peuvent être introduites notamment pour améliorer l'activité de l'enzyme. Dans ce contexte, on préférera un degré d'homologie d'au moins 70 % par rapport à la séquence native, avantageusement d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 % et plus préférentiellement encore d'au moins 95 %. Par exemple, l'invention concerne deux phytases aux séquences d'acides aminés différentes, notamment dans la partie N-terminale. L'homme du métier connaît les techniques permettant d'évaluer si l'homologue généré présente une activité modifiée par production de l'enzyme mutagénisée dans un hôte hétérologue.

La séquence de SEQ ID n° 1 est une séquence d'ADNc, c'est-à-dire dépourvue des introns de la phytase de maïs.

L'invention a notamment pour objet une séquence d'ADN identique ou homologue à plus de 70 % de tout ou partie de la séquence telle que définie dans SEQ ID N° 1.

De préférence, le fragment selon l'invention comprend la séquence complète de 1335 nucléotides telle que montrée sur SEQ ID n° 1, une séquence homologue, une séquence complémentaire, ou une séquence homologue à ladite séquence complémentaire. Le fragment comporte en particulier la séquence leader allant du nucléotide n° 1 à 31 de SEQ ID n° 1, ainsi que la séquence de terminaison

5 allant du nucléotide 1193 à 1335 de SEQ ID n° 1. En outre, de façon classique, il peut comporter ladite séquence de terminaison augmentée d'une queue poly A à son extrémité 3'.

10 Selon une variante encore préférée, le fragment selon l'invention comprend tout ou partie de la séquence codante allant du nucléotide n° 32 à 1192 de SEQ ID n° 1, ou son complémentaire, ou d'une séquence homologue ou complémentaire de ladite séquence homologue.

15 L'invention inclut également toute séquence capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec l'une des susdites séquences. A partir d'un fragment original d'une plante particulière, on peut ainsi isoler des fragments homologues d'autres plantes. D'autre part, à l'aide de l'ADNc, on a isolé les ADN génomiques correspondants.

20 La présente invention a donc également pour objet l'ADN génomique codant pour la phytase de la plante.

25 La présente invention a également pour objet un fragment constitué par de l'ADNc et comportant en outre une partie seulement des fragments introniques de l'ADN génomique. Les introns permettent dans certains cas d'améliorer la structure conformationnelle de l'ARN messager et ses taux d'expression.

Il doit être bien entendu que l'invention a également pour objet toute 30 séquence d'ADN équivalente, c'est-à-dire qui diffère des séquences mentionnées ci-dessus seulement par une ou plusieurs mutations neutres, c'est-à-dire dont le changement ou la substitution de nucléotides en cause n'affecte pas la séquence primaire de la protéine résultante.

35 De préférence, le fragment d'ADN selon l'invention sera associé à une séquence régulatrice appropriée pour sa transcription, sa traduction et son adressage, tels que des promoteurs et ses éventuels enhancers, et des terminateurs, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner ces différents signaux de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

La présente invention a également pour objet une séquence d'ADN identique ou homologue à plus de 70 % de tout ou partie de la séquence telle que définie dans SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 3. SEQ ID N° 2 représente la séquence nucléotidique correspondant au gène PHYT I (également représentée sur la figure 4); SEQ ID N° 3 représente la séquence nucléotidique correspondant au gène PHYT II (également représentée sur la figure 5).

5 Dans un mode de réalisation, le fragment selon l'invention comporte le promoteur de l'ADN génomique de la plante.

10 L'invention a également pour objet une séquence d'ADN caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie d'une séquence complémentaire ou complémentaire de l'homologue d'une séquence telle que définie dans SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 3. Elle a également pour objet l'utilisation d'une de ces séquences comme sonde moléculaire.

15 La présente invention a donc également pour objet le promoteur d'un gène de phytase de plante ainsi que le promoteur d'un gène de phytase de céréale et le promoteur d'un gène de phytase de maïs. Avantageusement, le promoteur d'un gène de phytase de plante contient tout ou partie du fragment allant du nucléotide n° 1 au nucléotide n° 2096 de la séquence telle que définie par SEQ ID N° 2, ou tout ou partie du fragment allant du nucléotide n° 1 au nucléotide n° 1328 de la séquence définie par SEQ ID N° 3.

20 Entrent également dans le champ de la présente invention, les promoteurs d'un gène de phytase de plante comprenant une séquence identique ou homologue à plus de 70 % de la séquence des fragments telle que ci-dessus définie ainsi que les promoteurs comprenant tout ou partie d'une séquence complémentaire ou complémentaire de l'homologue d'une telle séquence.

25 L'invention comprend également l'utilisation des susdits promoteurs dans des constructions moléculaires destinées à améliorer la qualité agronomique alimentaire ou industrielle d'une plante notamment la résistance aux pathogènes ou la disponibilité en nutriments.

30 La présente invention a aussi pour objet une cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comporte un fragment d'acide nucléique selon la présente invention, placé sous le contrôle de séquences régulatrices capables de commander l'expression de ladite phytase. Avantageusement, ces séquences régulatrices comprennent un promoteur tel que défini plus haut.

35 Dans une variante de réalisation lesdites séquences régulatrices sont capables de commander l'expression spécifiquement dans un type particulier de tissu, notamment dans l'albumen.

Comme exemple de signaux d'adressage chloroplastiques, on peut citer la séquence codant pour le peptide transit du précurseur de la petite sous-unité de la ribulose 1,5-biphosphatase carboxylase de *Pisum sativum*. Comme signaux d'adressage

5 mitochondrial, on peut citer la séquence codant pour le peptide transit du précurseur de la sous-unité bêta de l'ATP-aseFI mitochondriale de *Nicotiana plumbaginifolia*.

10 Ces peptides transits, ainsi que la méthionine N-terminale, sont normalement clivés dans les chloroplastes ou les mitochondries. L'expression des protéines dans les plastes a donc également l'avantage de produire une molécule dépourvue de la méthionine N-terminale comme la molécule naturelle.

15 Selon une autre variante, les séquences d'adressage peuvent être des séquences codant pour un peptide signal N-terminal ("prépeptide"), éventuellement en association à un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique (signal du type KDEL), ou un signal d'adressage vacuolaire ou "propeptide". La présence du peptide signal N-terminal ou prépeptide permet la 20 pénétration de la protéine naissante dans le réticulum endoplasmique où ont lieu un certain nombre de maturations post-traductionnelles, notamment le clivage du peptide signal, les N-glycosylations, si la protéine en question présente des sites de N-glycosylation, et la formation des ponts disulfures. Parmi ces différents signaux, le 25 prépeptide, responsable de l'adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique, est très utile. Il s'agit normalement d'un peptide signal N-terminal hydrophobe ayant entre 10 et 40 acides aminés et étant d'origine animale ou végétale. De préférence, il s'agit d'un prépeptide d'origine végétale, par exemple celui de la sporamine, de la lectine d'orge, de l'extensine végétale, de l'α-mating factor, de la 30 protéine de pathogénèse 1 ou 2.

Normalement, le peptide signal est clivé par une signal peptidase dès l'introduction co-traductionnelle du polypeptide naissant dans la lumière du RER (Reticulum Endoplasmique Granuleux). La protéine mature ne comporte plus cette extension N-terminale.

35 Pour obtenir la sécrétion, on peut par exemple utiliser le peptide signal de la sporamine A des racines tubérisées de la patate douce.

Les séquences d'adressage peuvent, outre le prépeptide, aussi comporter un signal de rétention endoplasmique, consistant en les peptides KDEL, SEKDEL ou HEKDEL. Ces signaux se trouvent normalement à l'extrémité C-terminale de la protéine et subsistent sur la protéine mature. La présence de ce signal a tendance à augmenter les rendements en protéines recombinantes.

Les signaux d'adressage peuvent, outre le prépeptide, comporter aussi un signal d'adressage vacuolaire ou "propeptide". En présence d'un tel signal, après

5 passage dans le RER, la protéine est adressée aux vacuoles des tissus aqueux, par exemple les feuilles, ainsi qu'aux corps protéiques des tissus de réserve, par exemple les graines, tubercules et racines. L'adressage de la protéine vers les corps protéiques de la graine est particulièrement intéressant en raison de la capacité de la graine à accumuler des protéines, jusqu'à 40 % des protéines par rapport à la matière sèche, 10 dans des organites cellulaires dérivés des vacuoles, appelés corps protéiques et en raison de la possibilité de stocker plusieurs années les graines contenant les protéines recombinantes à l'état déshydraté.

15 Comme propeptide, on peut utiliser un signal d'origine animale ou végétale, les signaux végétaux étant particulièrement préférés, par exemple la prosporamine. Le propeptide peut être N-terminal ("N-terminal targeting peptide" ou NTTP), ou C-terminal (CTTP). Dans la mesure où les propeptides sont normalement clivés dès l'entrée de la protéine dans la vacuole, ils ne sont pas présents dans la protéine mature.

20 L'utilisation du peptide signal ou prépeptide, peut conduire à la  
glycosylation de la protéine.

En l'absence de tout signal d'adressage, la protéine est exprimée dans le cytoplasme.

De préférence, l'accumulation de la phytase est réalisée dans l'albumen.

25 Comme vecteur de clonage ou d'expression comprenant le fragment, on peut citer les vecteurs comprenant une séquence d'ADN contenant au moins une origine de réPLICATION tels que des plasmides, des cosmides, des bactériophages, des virus etc. On utilisera en particulier, des plasmides.

La présente invention a donc aussi pour objet un procédé pour accroître la teneur en phytase dans une plante, caractérisé en ce qu'on induit une surexpression de l'enzyme phytase dans la plante à l'aide d'une cassette d'expression selon la présente invention. En d'autres termes, on induit une surexpression de l'activité phytase dans la plante.

On entend ici par "phytase" une définition fonctionnelle qui inclut toute phytase de plante capable de fonctionner comme un marqueur de sélection en conférant l'activité phytase à une cellule hôte déficiente en phytase ou possédant une activité enzymatique telle que mesurée par exemple selon l'exemple I.13. Cette définition inclut aussi toute phytase de plante capable de fonctionner dans une plante donnée pour accroître l'activité phytase de ladite plante. Ce terme inclut donc non

5 seulement l'enzyme spécifique de la plante spécifique à traiter, mais tout autre enzyme phytase d'autres plantes si cette phytase est capable de fonctionner dans les plantes à traiter.

10 On entend ici par "surexpression" aussi bien une augmentation du taux d'activité de phytase par rapport au taux exprimé dans une plante normale, qu'une dérégulation de l'expression conduisant à l'expression de l'activité phytase dans un tissu ou un compartiment et/ou à un stade de développement où celle-ci n'est normalement pas exprimée.

15 L'obtention de plantes exprimant de façon dérégulée la phytase, est obtenue en introduisant par les méthodes du génie génétique, un gène de phytase de plante éventuellement modifié de façon appropriée à obtenir la modification de l'expression, et de préférence la surexpression de la phytase dans la plante à améliorer.

20 Ces plantes pourront être modifiées par les méthodes du génie génétique décrites dans la littérature, par transformation de cellules suivie de leur régénération, ou par transformation de tissus ou de gamètes.

Dans un mode préféré de réalisation du procédé de l'invention, on introduit dans le génome de la plante une séquence codante fonctionnelle dans des conditions permettant son expression.

25 On entend par "séquence codante fonctionnelle" une séquence d'ADN codant pour un polypeptide tel que défini ci-dessus comme "phytase", ladite séquence peut donc être plus courte ou plus longue que la séquence codante totale du gène complet de l'enzyme. En particulier, la "séquence codante fonctionnelle" inclura la séquence codante pour un peptide signal en 5' et/ou en 3'.

30 Le gène étranger peut être un gène hétérologue, c'est-à-dire qui provient d'une plante différente que la cellule hôte, le gène codant pour un polypeptide ordinairement non produit par la plante dans le génome de laquelle il est introduit.

Le gène étranger introduit dans le génome de la plante peut aussi être un gène homologue au gène endogène, c'est-à-dire dont l'expression produit la phytase naturellement produite par la plante.

35 Par "conditions permettant son expression", on entend que le gène codant la phytase est placé sous le contrôle d'éléments assurant son expression.

En particulier, la séquence d'ADN codant pour la phytase est associée à une séquence régulatrice appropriée pour sa transcription, sa traduction et son

5 adressage, tels que des promoteurs et ses éventuels enhancers, et des terminateurs, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner ces différents signaux de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

10 Ledit gène fonctionnel codant pour la phytase peut être introduit dans des cellules de plantes selon des techniques connues. On pourra utiliser par exemple dans ce cas, mais non obligatoirement, le système de régulation du gène de la phytase.

On peut citer, tout d'abord, les méthodes de transfert direct de gènes telles que la micro-injection directe dans des cellules d'embryon de la plante (Neuhaus et Coll., 1987) ou l'électroporation (Chupeau et Coll., 1988) ou encore la précipitation directe au moyen de PEG (Schocher et Coll., 1986) ou le bombardement par canon de particules (McCabe et Coll., 1988).

On peut aussi infecter la plante par une souche bactérienne notamment d'*Agrobacterium tumefaciens* selon une méthode éprouvée (Schell et Van Montagu, 1983) ou d'*Agrobacterium rhizogenes* notamment pour les espèces récalcitrantes à la transformation (Chilton et Coll., 1982). La souche bactérienne comportera le gène codant pour la phytase sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène. La souche pourra être transformée par un vecteur dans lequel est inséré le gène codant la phytase sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène. Ce gène sera inséré par exemple dans un vecteur binaire tel que pBIN19 (Bevan, 1984) ou pMON 505 (Horsch et Klee, 1986) ou tout autre vecteur binaire dérivé des plasmides Ti et Ri. Il pourra aussi être utilement introduit par recombinaison homologue dans un plasmide Ti ou Ri désarmé, tel que pGV 3850 (Zambryski et Coll., 1983) avant la transformation de la plante.

30 Il a été montré récemment que des plantes monocotylédones telles que le riz et le maïs pouvaient être avantageusement transformées par *Agrobacterium tumefaciens*, riz : Hiei et al. 1994, The Plant Journal 6 : 271-282; maïs : Ishida et al. 1996, Nature biotechnology 14 : 745-750).

Par exemple, on transformera les espèces monocotylédones, notamment le riz, le blé et le maïs, en utilisant *Agrobacterium tumefaciens*.

35 A titre de vecteur d'expression comprenant le gène fonctionnel de la phytase selon l'invention, on peut citer les vecteurs comprenant une séquence d'ADN contenant au moins une origine de réplication telle que des plasmides, des cosmides, des bactériophages, des virus, etc. On utilisera en particulier des plasmides.

5                   Lorsque l'on introduit un gène fonctionnel codant pour une phytase selon l'invention dans le génome de la plante, ce sera de préférence sous le contrôle d'un promoteur hétérologue.

10                 Enfin, la présente invention a également pour objet des plantes ou organes végétaux à teneur en phytase accrue pouvant être obtenus par le procédé selon l'invention.

15                 La teneur en phytase peut être accrue globalement ou seulement localement, c'est-à-dire dans une partie de la plante ou un compartiment cellulaire particulier.

20                 On cite comme plantes transgéniques selon l'invention les céréales, notamment le maïs, le blé, l'orge, le sorgho, le seigle ainsi que le pois, le soja et la pomme de terre.

25                 La présente invention a plus particulièrement pour objet une plante, notamment transgénique, selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle produit des semences transgéniques exprimant une quantité accrue de phytase.

30                 La présente invention a également pour objet des semences séchées de plantes transgéniques selon l'invention et notamment des semences comportant une teneur en phytase accrue obtenue par expression spécifique du fragment d'acide nucléique ou de la séquence d'ADN selon la présente invention, dans la semence.

35                 La présente invention a en effet également pour objet un hôte végétal consistant en une plante ou organe végétal notamment transgénique dans lequel la phytase de plante peut être exprimée dans une partie de la plante ou un compartiment cellulaire où cette enzyme n'est pas produite naturellement, caractérisé en ce qu'on a introduit une cassette d'expression selon l'invention comportant des séquences régulatrices qui induisent une expression spécifique dans ladite partie de la plante ou ledit compartiment cellulaire. La plante ou l'organe végétal en question est avantageusement une céréale et plus avantageusement encore du maïs ou leurs organes correspondants.

40                 La présente invention a également pour objet une farine obtenue à partir d'une semence selon l'invention.

45                 Enfin, la présente invention a pour objet une composition pour l'alimentation humaine ou animale comprenant des semences, une farine de semences ou une phytase selon la présente invention.

5 De plus, la plante ou une partie de celle-ci peut être utilisée dans la ration alimentaire d'animaux monogastriques, d'une part pour réduire le taux de phytate dans le fumier ou lisier et d'autre part pour améliorer la digestibilité du phytate. Par exemple, la phytase exprimée agira sur la plante au cours de son développement. La phytase sera également utilisée dans les procédés de préparation alimentaire ou dans 10 les procédés d'extraction de l'amidon (procédé de trempage). L'activité phytasique générée est également utilisable pour valoriser les eaux de trempage récupérées ou les eaux de brassage. En particulier, la disponibilité accrue du phosphore rend ces eaux très utiles comme additifs pour milieux de culture ou supports de fermentation. En 15 outre, l'activité phytasique générée permet une meilleure récupération de l'inositol et de ses dérivés à partir des eaux de trempage ou de brassage.

L'invention concerne également l'utilisation de la phytase selon l'invention pour obtenir une meilleure disponibilité du calcium, par exemple à des fins alimentaires.

20 Si on utilise la phytase recombinante et non la plante elle-même, l'activité de la phytase s'exerce sur des phytates d'une autre origine végétale présentes dans la ration.

Les fragments d'ADN selon l'invention peuvent aussi être utilisés pour 25 transformer des microorganismes ou des cellules eucaryotes pour cloner et produire l'enzyme phytase.

La présente invention a donc également pour objet une méthode de production de phytase, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

30 a) transformation d'un hôte eucaryote ou procaryote, en particulier d'un végétal ou d'un microorganisme avec une cassette d'expression selon la présente invention, comportant des séquences régulatrices capables de commander l'expression d'une quantité accrue de phytase dans l'hôte végétal ou le microorganisme respectivement ;

b) culture du microorganisme transformé ou croissance de la plante transformée, et

35 c) extraction de la phytase de la culture de microorganismes ou des tissus végétaux transgéniques.

La présente invention a également pour objet une phytase recombinante obtenue par le procédé selon l'invention, préférentiellement sous forme d'un dimère

5 ou d'un hétérodimère, et des anticorps dirigés contre la phytase de la plante selon l'invention.

10 La présente invention a également pour objet l'utilisation de la phytase pour augmenter l'extractabilité des amidons des grains où elle s'exprime. Le phytate fait précipiter les protéines avec l'amidon de sorte que si l'on réduit le taux de phytate, l'extraction de l'amidon s'en trouve facilitée. L'ajout d'une phytase aux grains de plantes à partir desquels on souhaite extraire l'amidon permet de pallier la 15 précipitation des protéines par les phytates.

15 Plus précisément, la présente invention a donc pour objet l'utilisation d'une phytase selon l'invention et/ou de semences contenant une phytase selon l'invention pour extraire l'amidon à partir de grains de plantes.

Enfin, on peut utiliser les fragments d'ADN selon l'invention comme marqueur d'un phénotype lié à l'expression de la phytase.

20 L'invention concerne également l'utilisation d'une phytase selon l'invention ou l'utilisation de tout ou partie de plantes contenant une phytase selon l'invention, pour la production de myo-inositol à des fins thérapeutiques ou diététiques.

25 Le myo-inositol, forme nutritionnelle active de l'inositol, est un constituant du phospholipide phosphatidylinositol.

Le myo-inositol est connu pour ses vertus dans le domaine de la santé. On 30 lui a souvent attribué des effets sur la diminution de la concentration des triglycérides et du cholestérol dans le sang, et plus généralement pour la protection contre les maladies cardiovasculaires.

Il est reconnu que les composés issus d'un phospholipide tel que le myo-inositol ont des effets bénéfiques sur l'insomnie et l'anxiété.

35 Par ailleurs, la névropathie périphérique du diabétique est une des complications les plus paralysantes du diabète. Or, on suppose depuis déjà plusieurs années qu'une diminution du taux de myo-inositol est associée aux dégâts des fibres nerveuses des diabétiques souffrant d'une telle complication.

Aux Etats-Unis, les personnes adultes consomment environ 1 gramme/jour de myo-inositol le plus souvent sous forme de phospholipide ou d'acide phytique d'origine végétale.

5

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée qui va suivre faite en référence aux Figures 1 à 6.

10

La Figure 1 représente la séquence nucléotidique et la séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc phy S11.

15

Les acides aminés soulignés correspondent à deux séquences N-terminales obtenues à partir de la phytase de maïs purifiée. La séquence d'aa qui présente une homologie avec 33 aa de la phytase d'*Aspergillus* Phy A (van Hartingsveldt et al., 1993) est soulignée en pointillé. Les sites NcoI (CCATGG) et Asel (ATTAAT) utilisés pour le clonage dans le vecteur d'expression pET 14 (b) sont encadrés

La Figure 2 représente la comparaison des régions de recouvrement de 33 aa de la séquence protéique déduite de l'ADNc phy S11 et des séquences de phytases Phy A et Phy B d'*Aspergillus*.

20

Les ombres foncées indiquent les acides aminés conservés et les acides aminés similaires quant à eux sont encadrés et apparaissent en caractère gras. La séquence consensus RHGxRxP dont on suppose qu'elle correspond au motif accepteur de phosphate est soulignée. On procède à la comparaison en utilisant le programme FastA de GCG.

25

La Figure 3 représente les cartes de restriction déduites des clones génomiques isolés de la banque EMBL3.

Légende : EI : EcoRI ; HIII : Hind III ; SI : Sal I

 séquence génomique adjacente

 région chimérique

30

La Figure 4 représente la séquence nucléotidique du clone de classe I (P19.14 fragment HindIII / Sal I de 4,7 Kb) codant pour une protéine phytase de classe I correspondant au gène PHYT I (cette séquence correspond à SEQ ID N° 2).

35

Légende : les lettres minuscules correspondent à la séquence non codante, les lettres majuscules correspondent à la séquence transcrive, la séquence protéique déduite est indiquée en utilisant le code à trois lettres de la représentation des acides aminés

La Figure 5 représente la séquence nucléotidique du clone de classe II (P23.7 fragment HindIII de 3 Kb) codant pour une protéine phytase de classe II correspondant au gène PHYT II (cette séquence correspond à SEQ ID N° 3).

5                    Légende : les lettres minuscules correspondent à la séquence non codante, les lettres majuscules correspondent à la séquence transcrive, la séquence protéique déduite est indiquée en utilisant le code à trois lettres de la représentation des acides aminés.

10                    (+ 1161) : départ du produit Race n° 92  
                      (+ 1175) : départ de l'EST  
                      (+ 1314) : départ du produi. Race n° 93  
                      (+ 1351) : départ du produit Race n° 87  
                      (+ 1548) : départ du produit Race n° 54.

15                    La Figure 6 représente la comparaison de séquences protéiques des phytases de l'ADNc phy S11, de classe I et de classe II. L'alignement a été réalisé avec le programme "Clustal V multiple alignement". La séquence protéique est indiquée en utilisant le code à une lettre de la représentation des acides aminés.

## I. MATERIELS ET PROCEDES

### 20                    I.1) Conditions de germination des semences de maïs

On utilise successivement trois lignées homozygotes de Zea mays pour ce travail. On construit la bibliothèque d'ADNc avec des ARN extraits à partir de Zea mays c.v. M017 (Maisadour). L'ARN utilisé pour des analyses de Northern blot est extrait de Zea mays c.v. AM0406 (Maisadour). On imbibe des semences de maïs pendant douze heures dans de l'eau distillée aérée à la température ambiante puis on les transfère dans du sable humide à 26°C, avec une photo-période de huit heures (50 µE/s par m<sup>2</sup>).

25                    Des germinations de grains de maïs de la lignée B73 sont réalisées sur vermiculite à l'obscurité à 28°C. La lignée B73 a été choisie pour l'analyse des départs de transcription car les séquences génomiques ont été déterminées à partir de ce matériel génétique. Ainsi, les différences éventuelles notées entre les séquences des transcrits et celles de fragments génomiques ne pourront pas être attribuées à du polymorphisme intervariétal.

### 30                    I.2) Construction et criblage d'une bibliothèque d'ADNc

#### 35                    I.2a) ADN complémentaire

On purifie l'ARN total à partir d'embryons congelés (scutellum et axe embryonnaire) de jeunes plants de maïs âgés de trois à quatre jours, en utilisant du chlorhydrate de guanidine (Logemann et al., 1987). On sélectionne la fraction

5 poly(A)<sup>+</sup> sur des colonnes d'oligo dT (Pharmacia). On a synthétisé l'ADNc à deux  
brins en utilisant un nécessaire d'ADNc (Promega) et un adaptateur d'amorce d'oligo  
(dT)-NotI. Après ligature des adaptateurs Eco RI (Pharmacia), on digère l'ADNc avec  
NotI et on le clone de façon directionnelle dans  $\lambda$ gt11 (Promega). On obtient environ  
10  $1 \times 10^6$  recombinants indépendants après encapsidation (Stratagène) et infection d'*E.*  
*coli* souche LE392 (Promega). On amplifie la bibliothèque d'ADNc de  $\lambda$ gt11 dans *E.*  
*coli* souche RY1090. On procède au criblage immunologique des plages du phage en  
utilisant le système d'immuno-criblage ProtoBlot de Promega selon le protocole du  
fournisseur. On effectue le criblage avec un antisérum brut de lapin dirigé contre la  
phytase purifiée de maïs (Labouré et al., 1993). Après dilutions (1 : 1000 pour le  
15 premier criblage et 1 : 5000 pour les étapes de criblage suivantes), on traite  
l'antisérum avec des extraits de *E. coli* comme il est indiqué dans les directives  
Promega. On isole plusieurs phages recombinants positifs après criblage de  $1,5 \times 10^5$   
plages. On soumet alors ces phages positifs à un second criblage avec un anticorps  
plus spécifique purifié par affinité sur la sous-unité de phytase (Labouré et al., 1993).  
20 On estime la taille des inserts par réaction PCR avec des amores U5 (5'-  
AACAGCTATGACCATG-3') (SEQ ID N° 4) et U3 (5'-  
GTAAAACGAAACGGCCAGT-3) (SEQ ID N° 5), en utilisant les conditions  
d'amplification décrites par Marin et al. (1996). On sous-clone alors les inserts des  
phages intéressants dans les sites Eco RI - NotI d'un vecteur pBS-SK<sup>+</sup> (Stratagène).  
25 On détermine les séquences nucléotidiques sur un ADN à deux brins en utilisant la  
trousse PRISM Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), en suivant les instructions  
du fabricant et en utilisant un appareil à cycle thermique d'ADN Perking Elmer Cetus  
PEC480 et un séquenceur ABI 373A (Applied Biosystems).

30 On procède à des hybridations de plages de phages avec l'ADNc de phy  
AM10 partiel comme sonde, afin d'isoler des ADNc de pleine longueur, sur 360 000  
plages selon la technique de Benton et Davis (Sambrook et al., 1989) : on plonge le  
filtre, côté ADN vers le haut, dans la solution dénaturante pendant dix minutes, puis  
pendant six minutes dans la solution neutralisante.

35 On effectue l'analyse de la séquence totale de l'insert à 1,4 kb de phy S11  
sur les deux brins par le procédé de la terminaison de chaîne didésoxy (Sanger et al.,  
1977) en utilisant les matrices à un seul brin M13 mp18 et mp19 (la teneur élevée en  
GC dans cet insert ne permet pas son séquençage sur l'ADN à deux brins).

5 On procède à des analyses de séquence en utilisant la trousse UWGCG (University of Wisconsin Genetics Computer Group), manuel du programme de la trousse Wisconsin, version 8, septembre 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711.

10 Le programme Mac Vector (Kaufman *et al.* 1994, Eastman KODAK company New Haven, CT, USA) a aussi été utilisé pour les traitements des séquences génomiques.

### I.2b) ADN génomique

15 L'ADNc phytase phy S11 (fragment Eco RI / Not I contenant la séquence phy S11 de 1335 pb) est utilisé comme sonde pour le criblage d'une banque génomique lambda de maïs. La banque est une banque commerciale (Clontech, Palo Alto, CA, USA) construite à partir de fragments d'ADN extraits de plantules de la lignée B73. L'ADN est digéré partiellement par l'enzyme Mbo I. Les fragments génomiques ainsi obtenus, d'une taille de 8 à 22 Kb, sont clonés au site Bam H $\Pi$  du phage EMBL-3 (Frischauf *et al.* 1983, J. Mol. Biol. 170 : 827) et peuvent être excisés 20 par une digestion enzymatique Sal I.

25 Le criblage de la banque génomique a été réalisé suivant les indications de Sambrook *et al.* (1989, Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).  $10^6$  phages recombinants par banque d'ADN génomique (soit six équivalents génome maïs au total) sont étalés à différentes concentrations sur des boîtes de pétri en présence de la bactérie hôte. Des réplicats des plages de lyse sont réalisés sur filtre de nitrocellulose. Les phages recombinants contenant des fragments génomiques homologues à l'ADNc phytase sont repérés après hybridation des filtres avec la sonde phytase. Par superposition du filtre présentant des signaux positifs avec la boîte correspondante, la plage de lyse intéressante est prélevée et les phages remis en suspension. Les phages sont ensuite redilués, réétalés sur boîte de pétri pour subir un crible supplémentaire. Trois cribles successifs ont été réalisés afin d'obtenir des clones positifs isolés. Après le troisième tour de criblage, treize clones étaient positifs.

30 Après purification de l'ADN des treize clones génomiques isolés (protocole Qiagen<sup>®</sup>, Chatsworth, CA, USA), ceux-ci sont caractérisés par digestion enzymatique, hybridation et séquençage selon la technique classique de Sanger *et al.* (1977) à l'aide du kit commercial "fmol DNA Sequencing System" (Promega, Madison, WI, USA).

5 Les ADN des treize clones sont digérés par les enzymes de restriction Sal I, Hind III, Eco RI (simples digestions) et Sal I + Hind III (double digestion). Après électrophorèse sur gel d'agarose des différents fragments et transfert sur membranes de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham, Buckinghamshire, UK), ces dernières sont hybridées avec la sonde d'ADNc phy S11.

10 Plusieurs fragments issus des clones phagiques ont été sous-clonés dans le plasmide pBS II SK<sup>+</sup> (Stratagène, La Jolla, CA, USA) selon les techniques classiques de clonage (Sambrook *et al.* 1989, Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Les fragments sous-clonés présentés ci-dessous, contiennent une séquence homologue à l'ADNc phy S11.

15 Classe I : **P19.14** (fragment Sal I/Hind III de 4,7 Kb)

Classe II : **P13.2** (fragment Sal I de 5,5 Kb)

**P13.6** (fragment Hind III de 2,6 Kb)

**P13.13** (fragment Eco RI de 3,8 Kb)

**P23.7** (fragment Hind III de 3 Kb)

20 Le séquençage a été initié aux extrémités de ces inserts avec les amorces universelles Reverse et M13-20 (Biolabs, Beverly MA, USA) de "façon manuelle" (utilisation du Kit "fmol DNA Sequencing System" de Promega). La stratégie de progression par oligonucléotides a été adoptée pour compléter les données. Les séquences déterminées avec les oligonucléotides internes ont été obtenues par séquençage automatique auprès d'une société de service (Genome Express, Grenoble, France).

### I.3) Analyses de gel d'ARN

30 On extrait les ARN totaux en utilisant du chlorhydrate de guanidine (Logeman *et al.*, 1987) provenant d'embryons congelés à divers stades de germination. On fractionne la taille de quantités égales d'ARN sur un gel d'agarose à 1,2 % contenant du formaldéhyde (Sambrook *et al.*, 1989) et on les transfère sur une membrane Hybond N (Amersham). On procède aux préhybridations et hybridations à 42°C dans formamide à 50 %, 5 x Denhardt, 5 x SSPE, Sarkosyl à 0,5 %, ADN de sperme de saumon à 100 µg/ml. On lave deux fois les membranes à 42°C avec 2 x SSC, SDS à 0,1 % et une fois à 60°C pendant dix à trente minutes avec SSC à 0,2 %, SDS à 0,1 %, avant exposition au film.

### I.4) Surexpression de la protéine codée phy S11 dans *E.coli*

5 On clone un fragment NocI-Asel à 1150 pb de l'ADNc phy S11 (voir figure 1) entre les sites NocI et NdeI du vecteur d'expression pET14 (b) (Novagen). On obtient l'expression de la protéine en clonant le vecteur recombinant dans *E. coli* souche BL21 (Novagen).

On procède aux extractions et aux analyses des protéines selon les procédés décrits par le fournisseur. On effectue les analyses de Western blot avec l'anticorps purifié par affinité et on détecte l'activité de phosphatase sur gel de polyacrylamide non dénaturant, comme il a été décrit antérieurement (Labouré et al., 1993).

## I.5) Détermination de la séquence N-terminale

15 On électrophorèse de la phytase de maïs purifiée sur SDS-PAGE à 12,5 %  
et on effectue un électro-transfert sur une membrane de PVDF "Problott" (Applied  
Biosystems). La région correspondant à la sous-unité à 38 kDa est révélée par  
coloration avec du noir amido. On procède à une dégradation automatisée d'Edman de  
la protéine en utilisant un séquenceur Applied Biosystems 473 A avec les réactifs et  
les procédés du fabricant.  
20

## I.6) Cartographie des départs de transcription

Afin de déterminer le départ de transcription, nous avons choisi d'utiliser la méthode de RACE PCR (Rapid Amplification cDNA Ends, Chenchik 1995). La mise en application de cette technique a été réalisée grâce au kit "Marathon cDNA Amplification" de Clontech (Palo Alto, CA, USA)

Les embryons (tige embryonnaire et scutellum) âgés de un jour et un jour et demi ont été broyés séparément dans l'azote liquide. Les ARN totaux et les ARN messagers ont été extraits et purifiés à partir d'un gramme de broyat suivant les indications des kits utilisés : "RN<sub>A</sub>gents Total RNA Isolation System" et "polyATtract mRNA Isolation Systems" (Promega, Madison WI, USA).

## I.7) Cartographie génétique des loci homologues à l'ADNc phytase

La technique R F L P (Restriction Fragment Length Polymorphism) a été utilisée. C'est un outil très performant pour le développement de cartes de liaisons génétiques saturées (Murgueux *et al.* 1993, *Theor Appl Genet.* 87 : 278-287). La méthode Southern (1975, *J. Mol Biol.* 98 : 503-517) permet la mise en évidence des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction obtenus avec une enzyme donnée et une sonde donnée, qui correspondent à des emplacements définis sur le génome c'est-à-dire à des loci génétiques.

5 Pour la localisation chromosomique du gène ou des gènes correspondant à l'ADNc phytase, la sonde phy S11 - fragment Eco RI / Not I de 1361 pb - a été hybridée sur un transfert d'un gel d'électrophorèse contenant l'ADN digéré par Eco RI et Hind III de différentes lignées de maïs pour lesquelles des descendances en ségrégation étaient disponibles et utilisées pour la cartographie génétique du maïs. Le  
10 croisement A188 x HD7 a été choisi car un polymorphisme de la taille des fragments de restriction homologues à la sonde a été mis en évidence entre les deux lignées parentales. A188 est une lignée américaine (Université du Minnesota) et HD7 est une lignée haploïde doublée (Murigneux *et al.* 1993, Theor. Appl. Genet. 87: 278-287) issue d'une population synthétique comprenant du matériel d'origine chinoise essentiellement. La sonde phy S11 a par la suite été hybridée sur des membranes contenant l'ADN de 58 lignées recombinantes SSD ("Single Seed Descent" : lignées recombinantes obtenues par filiation monograine) issues de ce croisement. Sur les membranes contenant l'ADN digéré par Hind III, deux bandes de tailles différentes étaient observées pour chacun des parents. Dans la descendance, ces bandes coségrègent pour 55 individus, 2 individus possèdent les 4 bandes et un seul individu présente une bande de chacun des parents. Le même type de ségrégation est observé pour l'hybridation réalisée sur les membranes contenant l'ADN des lignées recombinantes digéré par Eco RI.  
15  
20

### I.8) Construction des gènes chimériques

#### 25 I.8a) Fusions GUS

Le plasmide pBIOS 255 a été obtenu par l'insertion du fragment de 1,3 kb provenant de P19.14 restreint à Sac I (position + 749) / Nco I (Nco I se situe au niveau de la première méthionine du gène porté par ce fragment génomique), dans le plasmide pRPA-RD-100 coupé à Sac I / Nco I. Ce dernier contient le gène GUS et le 30 terminateur Nos (Bevan *et al.*, 1983, Nature 304 : 184-187). Une deuxième construction avec un fragment promoteur plus grand (2,1 kb) a été élaborée. Le fragment P19.14 restreint à Eco RI / Sph I a été inséré dans le plasmide pBIOS 255 coupé à Eco RI / Sph I. Le plasmide résultant s'appelle pBIOS 261.

Le plasmide pBIOS 262 a été obtenu par l'insertion du fragment de 1,3 kb provenant de P23.7 coupé à Eco RI / Nco I (Eco RI, site du polylinker du vecteur et Nco I situé au niveau de la première méthionine du gène porté par ce fragment génomique) dans le plasmide pRPA-RD-100 (Eco RI / Nco I).  
35

5

**I.8b) Construction de gènes chimériques permettant une expression ectopique de la phytase de classe I (correspondant au clone P19.14, cf. II.4) ci-après) dans le grain et/ou la plante de maïs**

10 Dans un premier temps, les inventeurs ont élaboré un vecteur plasmidique de base, dénommé pBIOS 256 contenant l'ADNc phytase accolé au terminateur du gène de la nopaline synthétase (ter Nos) qui amène un signal de polyadénylation fonctionnel chez de nombreuses espèces végétales. Ce plasmide a été obtenu par clonage du fragment Sma I / Eco RV de 300 pb comportant le terminateur Nos (Bevan *et al.* 1983, *Nature* 304 : 184-187) du plasmide pBIOS 250 au site Bst XI (rendu "bouts francs" grâce à l'action de la T4 DNA polymérase) du plasmide phy S11. Le vecteur pBIOS 2500 avait été généré par délétion du fragment Sma I du plasmide pDM 302 (Cao *et al.* 1992, *Plant Cell Reports* 11 : 586-591).

15

**I.8b1) Construits porteurs des gènes PHYT I (phytase de classe I exprimée de façon constitutive dans le cytoplasme)**

20 Les constructions permettant l'expression de la phytase dans le cytoplasme de façon constitutive ont été réalisées de la manière suivante :

- clonage du fragment Hind III de pBIOS 250 comportant le promoteur Actine - intron Actine (pAct) (Mc Elroy *et al.* 1991, M.G.G. 231 : 150-160), dans pBIOS 256 restreint à Hind III. Le vecteur obtenu est appelé pBIOS 259 porteur du gène pAct - PHYT I - ter Nos ;
- clonage du fragment Bam HI / Nsi I (PHYT I - fragment ter Nos) de pBIOS 256, dans les sites Bam HI / Nsi I de pBIOS 220. Le plasmide pBIOS 220 est un construit comportant le promoteur 35S du CaMV et le terminateur Nos. Le vecteur obtenu est appelé pBIOS 264 porteur du gène p35S - PHYT I - ter Nos.

30 **I.8b1bis) Construits porteurs des gènes PHYT I (phytase de classe I exprimée dans le cycloplasme de l'albumen du grain de maïs)**

Les constructions permettant l'expression de la phytase dans le cytoplasme de l'albumen ont été réalisées de la façon suivante :

- clonage du fragment Bam HI / Nsi I de pBIOS 256 dans les sites BamHI / Nsi I de pDV 03000, plasmide contenant le promoteur HMWG (promoteur du gène d'une protéine de réserve du blé, la "High Molecular Weight Glutenin" ; Robert *et al.*

5 1989, *The Plant Cell* 1 : 569-578) et le terminateur Nos. Le vecteur obtenu est appelé pBIOS 258, porteur du gène pHMWG - PHYT I - ter Nos ;

10 - clonage du fragment Hind III / Bam HI du plasmide p $\gamma$ 63 dérivé de celui décrit dans Reina *et al.* (1990, N.A.R. 18 : 6425-6426) comportant le promoteur  $\gamma$ -zeine, dans pBIOS 259 digéré à Hind III et Bam HI, substituant ainsi le promoteur Actine et l'intron Actine de riz. Le vecteur obtenu, porteur du gène p $\gamma$ -zeine - PHYT I - ter Nos, est appelé pBIOS 263 ;

15 - de façon alternative le clonage sous le contrôle du promoteur  $\gamma$ -zeine peut être obtenu par le clonage du fragment Hind III / Sma I du plasmide p $\gamma$  63 comportant le promoteur  $\gamma$ -zeine, dans pBIOS 259 digéré à Hind III et Eco RV, substituant ainsi le promoteur Actine et l'intron actine de riz par le promoteur  $\gamma$ -zeine.

20 Le vecteur obtenu, porteur du gène p  $\gamma$  zeine -PHYT I - ter Nos, est appelé pBIOS 263bis.

**I.8b2) Construits porteurs des gènes Sec-PHYT I (phytase de classe I exprimée de façon constitutive dans l'espace extracellulaire)**

25 Pour l'ajout du signal d'adressage extracellulaire, nous avons choisi d'utiliser celui porté par la "Pathogenesis Related Protein", PR-S homologue à la thaumatin du tabac (Cornelissen *et al.* 1986, *Nature* 321 : 531-532). Les auteurs ont opté pour une stratégie de mutagénèse dirigée utilisant la PCR grâce au kit "Ex-Site<sup>TM</sup> PCR based Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene, La Jolla-USA) selon les recommandations du fournisseur.

30 Le plasmide pBIOS 256 sert de construction de base. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification sont les suivants :

35 - ol MUP1 : 5' CAT GAA CTT CCT CAA AAG TTT CCC CTT TTA TGC CTT CCT TTG TTT TGG CCA ATA CTT TGT AGC TGT TAC TCA TGC TGA CTC GGA AGG AGT AGC AGC AAA GGT GGC 3' (SEQ ID N° 6),  
- ol MUP2 : 5' GAT CAA ACA CTA AGC TCA ATA AGG ATG G 3' (SEQ ID N° 7)

40 Plusieurs plasmides recombinants triés par analyse de digestion restrictive ont été séquencés avec le Reverse primer. Un plasmide a été retenu et la structure du gène Sec-PHYT I a été confirmée par séquençage grâce à trois oligonucléotides.

45 - M13-20 primer  
- phy 5 (position 718 / 737 de phy S11)

5 - phy 6 (position 816 / 797 de phy S11)

Le plasmide résultant de l'addition du signal d'excrétion et contenant la partie codante de la phytase de classe I fusionnée est appelée pBIOS 265.

10 Lors du criblage des plasmides recombinants, le clone M2 n° 61 présentait l'addition parfaite de 60 nucléotides sur 76, définissant ainsi seulement une partie du signal d'excrétion. La séquence du reste de ce plasmide a révélé une substitution de base dans la partie codante (adénine à la place de guanine en position 853 de phyS11) n'altérant pas l'acide aminé codé par le triplet d'acide nucléiques affecté. Elle a montré également l'addition d'un doublet TA dans le partie 3' non traduite, juste avant la queue polyadénylée (en position 1334 de phyS11)

15 De façon alternative pour obtenir le gène Sec-Phyt I, le plasmide M2 n° 61 a été retenu comme matrice de base, pour ajouter la totalité du signal PR-S par une deuxième série d'expériences de mutagénèse dirigée. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification étaient les suivants :

20 - ol MUP9 : 5' GGA AGT TCA TGG ATC AAA CAC TAA GCT CAA TAA G3' (SEQ ID N° 8) ..

- ol MUP10 : 5' TTA AGA GTT TCC CCT TTT ATG CCT TCC TTT G 3' (SEQ ID N° 9)

(Les 15 nucléotides à rajouter sont portés par les deux oligonucléotides)

25 200 ng de matrice, 50 pmol des oligonucléotides MUP9 et MUP10, 10 nmol de chaque dNTP (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2 unités de Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Ma USA), dans son tampon pour un volume réactionnel de 50 µl ont été soumis aux paramètres d'amplification décrits ci-après (Perkin Elmer Cetus 9600 PCR, New Jersey USA) :

30 4 cycles - 1 min 95°C  
- 1 min 54°C  
- 4 min 72°C

21 cycles - 40 sec 94°C  
- 1 min 61°C  
- 4 min 72°C

35 1 cycle - 2 min 72°C

La totalité du produit d'amplification a été déposée sur gel d'agarose 1 % La bande correspondant au plasmide mutagénisé a été découpée puis éluee (Système Micropure 0,22 + Microcon 50 de Amicon, Ma USA).

5 Le produit purifié a été ligasé 16h à 12°C avec 3 unités de T4 DNA Ligase (Promega, WI USA), dans un volume réactionnel de 10 µl. Le plasmide a ensuite été transformé dans la souche Escherichia coli XL1 Blue selon les recommandations du fournisseur (Epicurian Coli® XL1-BLUE Supercompetent Cells 200236, Stratagène, LaJolla USA).

10 Plusieurs plasmides recombinants triés par analyse de digestion restrictive ont été séquencés avec le Reverse primer.

Un plasmide a été retenu et la structure du gène Sec-PHYT I a été confirmée par séquençage grâce à trois oligonucléotides :

15 - M13-20 primer,  
- phy5 (position 718/737 de phyS11),  
- phy6 (position 816/797 de phyS11).

Le plasmide résultant de l'addition du signal d'excrétion et contenant la partie codante de la phytase de classe I fusionnée est appelé pBIOS 265 bis.

20 La construction permettant une expression constitutive de la phytase excrétée a été obtenue de la manière suivante :

- clonage du fragment Hind III de pBIOS 250 comportant le promoteur Actine et l'intron Actine, dans le site Hind III de pBIOS 265. Ce vecteur a été appelé pBIOS 268 et il porte le gène chimérique pAct - Sec-PHYT I - ter Nos.

25 De façon alternative, la construction permettant une expression constitutive de la phytase excrétée a été obtenue de la manière suivante :

- clonage, par substitution, du fragment EcoRV / Ncol de p BIOS 265 bis comportant le signal d'excrétion et l'extrémité 5' de la partie codante de la phytase de classe I, dans les sites EcoRV / Ncol de pBIOS 259. Ce vecteur a été appelé pBIOS 268 bis et il porte le gène chimérique p Act - Sec-PHYT I- ter Nos.

30 **I.8b2bis) Construits porteurs des gènes Sec-PHYT I (phytase de classe I exprimée dans l'espace extracellulaire de l'albumen du grain de maïs)**

Les constructions permettant une expression dans l'albumen de la phytase excrétée ont été obtenues de la manière suivante :

35 - clonage du fragment Hind III / Bam HI de p $\gamma$ 63 comportant le promoteur  $\gamma$ -zein dans les sites Hind III et Bam HI de pBIOS 265. Ce vecteur est appelé pBIOS 269 et il porte le gène chimérique p $\gamma$ -zein - Sec-PHYT I - ter Nos.

5 - clonage du fragment Bam HI / Nsi I de pBIOS 265 comportant Sec-PHYT I et une partie du terminateur Nos dans les sites Bam HI / Nsi I de pDV 03000. Ce vecteur est appelé pBIOS 270 et il porte le gène chimérique pHMWG - Sec-PHYT I - ter Nos.

10 De façon alternative, les constructions permettant une expression dans l'albumen de la phytase excrétée ont été obtenues de la manière suivante :

15 - Clonage, par substitution, du fragment BamHI / Ncol de pBIOS 265 bis comportant le signal d'excration et l'extrémité 5' de la partie codante de la phytase de classe I, dans les sites BamHI et Ncol de pBIOS 263 bis. Ce vecteur est appelé pBIOS 269 bis et il porte le gène chimérique p $\gamma$  zeine - Sec-PHYT I - ter Nos.

20 - Clonage, par substitution, du fragment EcoRI / SmaI de pBIOS 265 bis comportant le signal d'excration et l'extrémité 5' de la partie codante de la phytase de classe I, dans les sites EcoRI et SmaI de pBIOS 258. Ce vecteur est appelé pBIOS 270 bis et il porte le gène chimérique pHMWG- Sec-PHYT I- ter Nos.

25 **I.9) Evaluation de l'activité promotrice par analyse de l'activité transitoire**

30 Une étude de l'activité promotrice peut être avantageusement réalisée en introduisant, par la méthode du canon à particule, dans des cellules issues du tissu où cette activité est recherchée, la zone promotrice à évaluer fusionnée à un gène rapporteur dont l'activité est facilement décelable. Le gène GUS (E. coli  $\beta$ -glucuronidase) peut être utilisé à cet effet. Chaque cellule ayant reçu ce gène chimérique dans des conditions permettant son expression, produit la protéine  $\beta$ -glucuronidase. Cette protéine peut être aisément détectée *in situ* 48 h après bombardement par la méthode décrite par Jefferson (1987, Plant. Mol. Biol. Report., 5(4) 387 : 405). Les cellules produisent alors un pigment bleu qui permet leur observation. Si le promoteur est actif dans le tissu bombardé et au stade considéré, plusieurs dizaines de cellules à la surface de l'explant vont acquérir cette couleur bleue. Aucun spot ne sera visible si le promoteur est inactif dans les conditions utilisées.

35 Des grains de maïs sont stérilisés par immersion de 20' dans une solution saturée en Hypochlorite de calcium, puis mis à germer en condition stérile entre deux feuilles de papier buvard imbibées d'eau et placées à 25°C. 1 jour, 3 jours et 4 jours après germination les grains sont disséqués de façon à placer sur un milieu gélosé de

5 bombardement, des fragments de tissus tels que aleurone, scutellum, épicotyle et mésocotyle. Le milieu de bombardement peut être par exemple composé de 0,2 M de Mannitol et de 0,2 M de Sorbitol solidifié avec 8 g/l d'Agar. Les tissus sont ensuite bombardés. Les plasmides contenant le promoteur à étudier fusionné au gène GUS  
10 sont purifiés sur colonne Qiagen® en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungstène (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (1987, *Nature* 327 : 70-73). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon. L'optimisation des conditions de bombardement peut dépendre du type d'appareil utilisé et fait partie des techniques normalement maîtrisées par l'homme de l'art. Quarante-huit heures après le bombardement, les  
15 tissus sont colorés comme décrit par Jefferson puis observés.

### I.10) Production de maïs transgéniques

#### I.10a) Méthode de transformation génétique

La transformation génétique du maïs, quelle que soit la méthode employée (électroporation, *Agrobacterium*, microfibres, canon à particules) requiert généralement l'utilisation de cellules indifférenciées en divisions rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal friable embryogène (dit de type II) de maïs.

Ces calcs sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype Hi II ou A188 x B73 selon la méthode et sur les milieux décrits par Armstrong (in *The Maize Handbook* : 1994, M. Freeling, V. Walbot Eds ; pp 665 - 671), les calcs ainsi obtenus peuvent être multipliés et maintenus par repiquages successifs tous les 15 jours sur le milieu d'initiation.

Des plantules sont régénérées à partir de ces calcs en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain *et al.* (1989, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 18 : 143-151). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées ou auto-fécondées.

On utilise une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés dans le génome de la plante. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules. Les cellules cibles sont des fragments de calcs d'une surface de 10 à 20 mm<sup>2</sup>. Ils sont disposés, 4 h avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte, au centre d'une boîte de pétri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de 0,2 M de mannitol + 0,2 M de sorbitol. Les tissus sont ensuite bombardés comme décrit précédemment

5 Les boîtes de cals ainsi bombardés sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais® puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24 h après, puis tous les 15 jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif dont la nature et la concentration peuvent varier selon le gène utilisé. Les agents sélectifs utilisables sont généralement des composés actifs de certains herbicides (Basta®, Round up®) ou certains antibiotiques (Hygromycine, 10 Kanamycine, ).

Il apparaît après 3 mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent sélectif, ceux-ci sont habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0,8 cal par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de façon à régénérer des plantules. Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non transformées, toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

#### I.10b) Utilisation du gène Bar pour la sélection

Le gène Bar de *Streptomyces hygroscopicus* code pour une phosphinothricine acyl transférase (PAT) qui inactive par acétylation la phosphinotricine - molécule active de l'herbicide Basta®. Les cellules portant ce gène sont donc rendues résistantes à cet herbicide et peuvent être sélectionnées par son intermédiaire.

Pour la transformation des céréales, la séquence codante du gène Bar est  
sous le contrôle d'une région régulatrice permettant une expression forte et  
constitutive dans les cellules végétales. Une telle région peut avantageusement être  
constituée par le promoteur et le premier intron du gène Actine de riz tels que décrits  
par Mc Elroy (1991, Mol. Gen. Genet. 231: 150-160).

35 Ce gène chimérique est cloné sur un plasmide permettant son amplification par *Escherichia coli*. Ce plasmide pDM 302 Cao (1992, Plant Cell Report 11 : 586-591), après amplification puis purification sur colonne Qiagen®, peut être utilisé en transformation génétique du maïs en utilisant par exemple la méthode

5 décrite précédemment. Dans ce cas les milieux de cultures destinés à la sélection des cellules transformées sont additionnés de 2mg/l de Phosphinothricine

10 Pour l'introduction des construits phytase devant conduire à une expression ectopique des protéines issues des gènes PHYT I et Sec-PHYT I, une technique dite de cotransformation peut avantageusement être utilisée. On procède à une coprécipitation des deux plasmides (le plasmide porteur du gène de selection et l'un des différents plasmides "phytase") sur les particules de tungstène, la quantité totale d'ADN précipité sur les particules restant identique à ce qu'elle est dans le protocole standard (5 µg d'ADN pour 2,5 mg de particules) chaque plasmide représentera environ la moitié du total d'ADN utilisé.

15 L'expérience montre qu'avec cette méthode, la cointégration des plasmides dans les cellules végétales est l'événement le plus fréquent (de l'ordre de 90 %) c'est-à-dire que pratiquement chaque plante ayant intégré le gène Bar et ayant été sélectionnée par son intermédiaire portera aussi le gène "phytase". Ainsi, le pourcentage de plantes sélectionnées exprimant le gène "phytase" est d'environ 70 %.

20 Les gènes ainsi introduits sont généralement liés au sens génétique, le gène "phytase" peut ainsi avantageusement être suivi dans les descendances grâce à la résistance à l'herbicide qui lui est étroitement associée.

### I.11) Amplification des gènes de phytase par RT-PCR

25 Chaque RT-PCR est réalisée sur 10 mg de RNAs totaux préalablement traités durant 1 heure à 37°C par la DNase-RNase free (Boehringer) en présence de RNasin (Boehringer), dans le but d'éliminer d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique. Les RNAs sont ensuite déprotéinisés par un traitement au phénol-chloroforme et précipités.

30 La synthèse du brin de cDNA complémentaire des RNAs phytases est réalisée pendant 30 min à 37°C en présence de transcriptase réverse (BRL). La transcription est initiée par un oligonucléotide «D» complémentaire d'une séquence commune aux deux gènes hybridant 546 bp en aval de l'ATG pour le gène I et 552 bp en aval de l'ATG pour le gène II. La séquence de l'oligo «D» est la suivante : CTGGGAGTAGGCGCGGGAGTG (SEQ ID N° 15)

35 Les amplifications sont réalisées sur une fraction de la réverse transcription, en présence d'un oligonucléotide «C» :

5 GCTGTAGCAGTCGCTACCG (SEQ ID N° 14), commun aux deux gènes et hybrideant 214 bp en aval de l'ATG pour le gène I et 220 bp en aval pour le gène II. Les deuxièmes oligonucléotides utilisés débutent à l'ATG initiateur et sont spécifiques de chaque gène. L'oligo «A», complémentaire du gène I, à la séquence suivante : ATGGACTCGGAAGGAGTAGC (SEQ ID N° 12) et l'oligo «B» complémentaire du gène II à la séquence : ATGGACTCGGAAGGAGTTGT (SEQ ID N° 13);

10

Les conditions de PCR sont les suivantes : 94°C, 1 min ; 60°C, 1 min ; 72°C, 1 min, répétées 30 fois. Les produits de PCR sont analysés sur gel d'agarose à 2 %.

15 **I.12) Disponibilité du phosphore de maïs transgéniques exprimant ectopiquement la phytase**

Ces maïs transgéniques ont été cultivés au champ, et des quantités de l'ordre de 16 kg par lot ont été récoltées.

20 L'étude zootechnique consiste à étudier la disponibilité du phosphore de ces maïs chez le poulet de chair. On retient pour cela deux critères biologiques de mesures : rétention ou bilan digestif du phosphore et minéralisation osseuse.

Sur les lots de maïs testés ont été analysées leurs teneurs en phosphore (P) total, en P phytique, ainsi que leur activité phytasique selon une adaptation de la méthode de Bitar et Reinhold (1972).

25 Chaque régime est composé de 3 parties : une base, la source de phosphore à tester et une partie d'ajustement.

La base est commune à tous les régimes ; elle assure une apport minimum et constant de phosphore et de protéines, ainsi que les oligo-éléments et vitamines nécessaires pour couvrir les besoins des animaux

30 La source de phosphore à tester est constituée par les différents lots de maïs selon l'invention ou bien par le phosphate monocalcique de référence (digestibilité de 100 %).

Les lots à tester sont introduits à raison d'environ 50 %, de manière à ce que la quantité de phosphore à tester soit identique pour tous les régimes, et le phosphore monocalcique à 3 taux : 0 ; 0,45 et 0,90 %)

5                   La partie d'ajustement est constituée de matières premières n'apportant pas de phosphore (amidon de maïs, acides aminés, huile, calcium, cellulose) et permet d'équilibrer les régimes en acides aminés, en énergie et en calcium. Seul le phosphore des régimes expérimentaux est très en-dessous des recommandations pour le poulet de cet âge (sinon relargage de P dans les urines qui sont mélangées avec les fèces, et 10 impossibilité de mesurer la digestibilité du P).

10                  Les régimes ont été granulés à la vapeur (presse La Meccanica, type CLM 200, filière de 2,5 mm x 35 mm).

15                  Pour tester l'influence du process, certains régimes ont été testés à la fois en farine, en granulés (température du process de l'ordre de 60°C) et en granulés avec des températures de l'ordre de 75°C.

20                  Chaque régime expérimental est testés sur 8 répétitions ou cages de 2 poulets mâles ISA JV15 de même poids. La conduite expérimentale est celle décrite par Bruno Barrier-Guillot et al. (1994).

25                  Les lots expérimentaux sont constitués de :

- 20                  -     un maïs témoin seul ;
- un maïs témoin additionné de 500 Unités (UP) de phytase microbienne ;
- une maïs additionné de 1000 Unités (UP) de phytase microbienne ;
- les lots de maïs transgéniques selon l'invention.

30                  Les aliments expérimentaux sont distribués à volonté de J14 à J25. La collecte de fientes s'effectue toutes les 24 heures pendant trois jours de J22 à J25. Les excreta sont regroupés par cage. Ils sont ensuite congelés à - 20°C, puis lyophilisés pendant 72 heures avant d'être broyés. Un échantillon par cage est ensuite prélevé pour la détermination de la teneur en phosphore total. A J25, les poulets sont sacrifiés et les deux phalanges centrales du doigt majeur de chaque patte sont prélevées pour la détermination du taux de cendres.

                        La disponibilité *in vivo* du P est appréciée selon deux critères, soit par la mesure du P retenu par l'animal (bilan digestif), soit par le test de minéralisation osseuse (Sauveur, 1983).

5

Sur chacun des régimes est mesuré le coefficient de rétention du phosphore (CR P). Le CR P des différents maïs expérimentaux est ensuite calculé par différence avec le CR P de la base mesuré sur le régime constitué uniquement de la base et de la partie d'ajustement.

10

La disponibilité du phosphore des maïs expérimentaux mesurée par le test de minéralisation osseuse est calculée par le rapport entre la quantité de cendres obtenues avec le régime contenant la matière première, et la quantité de cendres obtenue avec les régimes contenant le phosphore monocalcique (calculée par régression à l'aide des 3 régimes de cette gamme étalon pour une même quantité de phosphore ingérée).

15

### I.13) Dosage de l'activité phytasique

#### I.13.a) Extraction des protéines de maïs en vue des dosages d'activité phytase

20

Un gramme de matériel congelé (feuilles ou graines de maïs transgéniques et jeunes plantules de maïs non transgénique – germination agées de 5 ou 6 jours- ) est broyé à l'état de poudre dans l'azote liquide. Le matériel broyé est transféré dans 10 ml de tampon d'extraction (100 mM acétate de sodium, pH 4,8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,5 à 1 mM Pefablock SC, antiprotéase (Interchim, Montluçon)). Les échantillons sont agités énergiquement pendant 15 minutes au froid et les extraits sont centrifugés 20 min à 8000 rpm (Sorvall, SS34). Les surnageants sont récupérés et éventuellement filtrés sur miracloth. Ensuite les protéines sont précipitées par addition de SO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> à 60 % de la saturation à 0°C : cette précipitation est indispensable, sinon le phosphate provenant des graines et contenu dans les extraits interfère avec le dosage. Les culots protéiques sont repris dans 2 ml de tampon acétate 50 mM, pH 4,8 et après resuspension, mis à dialyser sur la nuit contre 3 fois 100 ml du même tampon. Les protéines insolubles après dialyse sont éliminées par centrifugation (on a vérifié que ces précipités ne contenaient pas de phytase). L'activité est mesurée sur le surnageant.

25

30

#### I.13.b) Mesures d'activité phytase

35

Il s'agit de la méthode de Gibson et Ullah, légèrement modifiée (Arch. Biochem. Biophys., 1988, 260, 503-513). L'activité est mesurée à 55°C. Chaque tube eppendorf (1ml) contient 450 ml acétate de sodium 50 mM, pH 4,8, 2 mM sodium

5 phytate et 2 mM CaCl<sub>2</sub>. On ajoute l'extrait à tester, 50 ml dans acétate de sodium 50 mM, pH 4,8 ; après 1 h d'incubation à 55°C, le phosphate inorganique libéré est mesuré de la façon suivante : on ajoute à chaque tube 750 ml du mélange : acétone : 5N SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> : 10 mM ammonium molybdate (2:1:1) et 50 ml d'acide citrique 1M. Après homogénéisation au vortex, les tubes sont centrifugés 3 min à 3000XG pour 10 éliminer tout précipité dû à l'acétone.

15 Pour chaque essai un témoin identique est gardé à 0°C pendant l'heure d'incubation. Ce témoin utilisé comme zéro, permet d'éliminer les absorbances possibles dues aux extraits. L'absorbance est mesurée à 355 nm. La quantité de phosphate est évaluée à l'aide d'une courbe standard établie entre 2,5 et 200 nmoles de phosphate.

20 L'activité est exprimée en nmoles de phosphate libérées en 1 heure à 55°C, par mg de protéines. Les protéines sont dosées sur les extraits par la méthode classique de Bradford.

## 20 II. RESULTATS

### II.1) Isolement et caractérisation d'un ADNc codant pour une phytase de jeunes plants de maïs

25 On construit une bibliothèque d'ADNc dans le vecteur d'expression λgt11 en utilisant des ADNc synthétisés avec des ARNm polyadénylés isolés à partir de jeunes plants de maïs âgés de trois à quatre jours. On cible la bibliothèque avec l'antisérum brut de lapin dirigé contre la sous-unité de phytase purifiée à partir des jeunes plants de maïs. Le criblage initial aboutit à l'isolement de douze clones positifs. Lorsqu'on teste avec l'antisérum purifié par affinité sur la sous-unité de phytase, un seul clone donne une forte réponse positive. On sous-clone l'insert correspondant dans le vecteur pBS-SK<sup>+</sup> et on le séquence. Il contient 930 pb avec un cadre ouvert de lecture codant pour 139 aa. On utilise cet ADNc marqué, appelé phy AM10, comme sonde pour cibler la même bibliothèque afin de rechercher des clones de pleine longueur correspondants. On isole plusieurs clones positifs contenant un insert d'environ 1400 pb. On séquence entièrement l'insert d'un de ces clones, appelé ADNc phy S11. La séquence nucléotidique de l'ADNc phy S11 contient 1335 pb avec une teneur élevée en GC (65 %) et présente un cadre ouvert de lecture pour un polypeptide à 387 aa (figure 1). La présence d'un codon d'arrêt (TGA) deux codons en amont du premier ATG suggère que cet ATG est le codon d'initiation et montre 30 35

5 que la séquence de codage est complète. Cet ADNc présente 31 pb de séquences non traduites en 5' et 147 pb de séquence non traduite en 3'. On trouve un signal de polyadénylation AATAAA décrit pour les plantes supérieures (Joshi, 1987) (position 1236 - 41) à 63 nucléotides en amont de l'extension poly-A.

10 La taille de la protéine codée déduite de la séquence d'acides aminés est de 41 kDa, correspondant à la taille de la sous-unité phytase détectée par analyse Western blot des protéines totales extraites de jeunes plants (Labouré et al., 1993). Il faut mentionner que la sous-unité de la phytase purifiée selon le procédé décrit antérieurement est toujours légèrement plus petite (environ 38 kDa), ce qui suggère que des clivages spécifiques apparaissent au cours de la purification. On détermine 15 l'extrémité N sur la sous-unité purifiée. Le peptide à 38 kDa semble être un mélange de deux peptides : un peptide mineur avec une extrémité N XXEDGESKAGMTDL (SEQ ID N° 10) et un peptide majeur commençant par la séquence d'acides aminés AGMTDLLMLTDKSQL (SEQ ID N° 11). Ces deux séquences qui se recouvrent partiellement sont localisées respectivement dans les positions 19- 32 et 27 - 41 sur la 20 séquence d'aa déduite de l'ADNc phy S11 (figure 1), ce qui confirme que cet ADNc code bien pour la sous-unité de phytase et que le premier ATG est le codon d'initiation.

25 Une recherche sur ordinateur des similitudes entre la séquence d'acides aminés déduite et d'autres protéines dans plusieurs bases de données utilisant le programme FastA de la trousse UWGCG a révélé une homologie à 96% avec un EST indéterminé à 162 pb de *Zea mays* (numéro d'accès : T20338). On a également trouvé une similitude de 55 % (30 % d'identité) avec une séquence d'aa encodée par 30 un ADNc d'*Hordeum vulgare* (numéro d'accès : X82937) dont on a signalé qu'elle est induite par le jasmonate, et dont la fonction est inconnue (J. Leopold, 1994, non publié).

35 Lorsqu'on compare la séquence d'acides aminés pour laquelle code l'ADNc phy S11 avec celle de la phytase phy A d'*Aspergillus niger* en utilisant le programme Best Fit de la trousse UWGCG, on trouve que la seule zone significative de similitude correspond à un recouvrement de seulement 33 aa (souligné en pointillés dans la figure 1). La figure 2 montre l'alignement de cette séquence de maïs avec les séquences correspondantes des phytases Phy A et Phy B d'*Aspergillus* : cette séquence du maïs présente 84 % de similitude (27 % d'identité) avec la séquence correspondante de la phytase Phy A d'*Aspergillus* et 79 % de similitude avec celle de

5 la phytase de Phy B. Ces séquences des phytases d'*Aspergillus* contiennent le motif consensus RHGxRxP (souligné en figure 2) caractéristique des phosphatases acides de la levure, de *E. coli* et de certains mammifères, et dont on pense qu'il s'agit de la région accepteur de phosphatase (Piddington et al., 1993).

10 **II.2) Analyse de l'expression du gène de phytase par Northern blot à divers stades de la germination du grain de maïs**

15 Pour examiner si l'accumulation de la protéine signalée dans les jeunes plants de maïs au cours des premiers jours de la germination (Labouré et al., 1993) est en relation avec une augmentation de la teneur en ARNm correspondant, on détermine les niveaux de produit de transcription par analyse de Northern blot. On extrait l'ARN total de semences sèches, on hydrate les semences pendant douze heures dans de l'eau aérée, on transfère les semences dans du sable humide pendant 1, 2, 3, 5 et 6 jours. On compare avec l'ARN extrait de feuilles matures. Dans chaque cas, on soumet 10 µg d'ARN à une analyse de Northern blot, en utilisant l'ADNc phy S11 comme sonde. On ne détecte aucun produit de transcription Phy S11 dans les ARN totaux provenant de semences sèches ou provenant de semences imbibées pendant douze heures dans de l'eau aérée. On trouve que l'ADNc phy S11 s'hybride à un ARNm unique d'environ 1400 pb, qui apparaît au cours du premier jour de germination à 26°C, atteint son plus haut niveau au jour 2, puis diminue progressivement du jour 3 au jour 6. On n'observe qu'une très légère hybridation avec l'ARNm provenant de feuilles matures. Cette cinétique de l'accumulation d'ARNm est compatible avec ce qui a été décrit antérieurement pour l'accumulation de phytase, mais le niveau maximum d'ARN est obtenu deux jours avant le niveau maximum signalé pour l'accumulation de protéine.

20 **II.3) Expression de l'ADNc phy S11 dans *E. coli***

25 Pour tester si l'ADNc phy S11 code pour la phytase fonctionnelle du maïs, on cherche à exprimer le gène dans *E. coli*. On insère la séquence de codage complète en phase au site Nco I du vecteur pET-14b, sous la commande des signaux de transcription et de traduction du bactériophage T7. On transfère le plasmide pET.S11 résultant dans l'hôte d'expression BL21 dans lequel on peut induire l'expression de T7 par IPTG. On extrait les protéines solubles totales provenant de *E. coli* non transformées ou transformées avant et après induction avec IPTG, dans des conditions dénaturantes, et on analyse sur SDS-PAGE. La coloration du gel par le bleu Coomassie révèle une bande faible à 40 kDa, qui n'est présente qu'après induction par

5 IPTG. Lorsqu'on analyse les mêmes extraits par analyse de Western blot, on procède comme suit : on sépare les protéines totales (10 µg par piste) extraites de *E. coli* BL21 sur SDS/PAGE à 12,5 % et on effectue un électrobuvardage sur une membrane de nitrocellulose. On repère la protéine avec l'anticorps purifié pour : 1) BL21 non transformé, 2) BL21 transformé avec pET14 recombinant, sans induction par IPTG, 10 3), 4) et 5) BL21 transformé avec pET14 recombinant au bout de 1, 2 ou 3 heures d'induction respectivement, 6) 10 µg de protéines totales de jeunes plants de maïs de cinq jours et 7) 1 µg de phytase purifiée à partir de jeunes plants de maïs.

15 L'anticorps de phytase réagit de façon croisée avec un polypeptide provenant des extraits de *E. coli* induits qui migrent exactement aux mêmes niveaux que le polypeptide détecté sur les protéines totales extraites de jeunes plants de maïs de cinq jours. De façon intéressante, la protéine synthétisée dans *E. coli* subit des clivages aboutissant à un peptide de même taille que la sous-unité de la phytase purifiée. Lorsqu'on sépare des protéines solubles sur PAGE dans des conditions non 20 dénaturantes et qu'on les analyse par Western blot, on observe une protéine d'environ 80 kDa dans les extraits de *E. coli* induits. Cette protéine migre au même niveau que la protéine native provenant de jeunes plants de maïs, ce qui indique que les sous-unités synthétisées dans *E. coli* sont capables de s'assembler. Cependant, lorsqu'on 25 teste l'activité de phosphatase sur le gel, on n'observe pas d'activité au niveau de la protéine réassemblée provenant de l'extrait de *E. coli*. Lorsqu'on ajoute de la phytase de maïs purifiée à l'extrait de *E. coli* une activité est présente, ce qui montre qu'aucune substance inhibitrice n'est présente dans l'extrait.

30 En résumé, l'immunocriblage d'une bibliothèque d'ADNc de jeunes plants de maïs a permis l'isolement d'un ADNc appelé phy S11, codant pour un polypeptide à 41 kDa qui correspond en fait à la sous-unité de phytase détectée par des analyses de Western blot dans des extraits de protéine totale provenant de jeunes plants de semis. On a déterminé la séquence N-terminale de la sous-unité de phytase purifiée : on trouve un mélange de deux séquences correspondant aux acides aminés 35 19 - 32 et 27 - 41 de la séquence déduite de l'ADNc phy S11. Ce résultat est en accord avec les différences observées entre la taille de la sous-unité révélée par Western blot sur les extraits protéiques totaux provenant de jeunes plants de semences et celle de la protéine purifiée. La correspondance entre les séquences d'aa déterminées sur la protéine purifiée et celle déduite d'après la séquence nucléotidique de l'ADNc phy S11, confirme que cet ADNc code bien pour la sous-unité de phytase

5 L'utilisation de l'ADNc phy S11 comme sonde pour estimer les niveaux  
d'ARNm de phytase au cours des premiers jours de germination montre clairement  
que l'accumulation de la protéine signalée antérieurement (Labouré et al., 1993) est en  
corrélation avec une forte augmentation du niveau de produit de transcription  
correspondant. En fait, on ne détecte aucun ARNm dans les grains secs ou dans des  
10 grains échelonnés en douze heures, tandis qu'on mesure déjà une accumulation  
significative du produit de transcription un jour après transfert dans des conditions de  
germination. Le niveau maximum d'ARNm est atteint au bout de deux jours, ce qui  
correspond au stade de l'extrusion radiculaire. Par conséquent, l'induction de  
15 l'accumulation d'ARNm de phytase se produit à un stade très précoce du processus de  
germination. Dans des travaux antérieurs, on a montré que l'accumulation de la  
protéine ne culmine qu'au bout de quatre jours d'imbibition. Cette différence entre la  
cinétique d'accumulation du produit de transcription et de la protéine suggère qu'une  
20 commande de traduction peut apparaître outre la régulation du niveau d'ARNm.

25 L'expression dans *E. coli* en utilisant le vecteur pET14 permet la  
production de la sous-unité de phytase et son assemblage comme on le détecte par  
Western blot. Cependant, la protéine cible est produite en faible quantité, et on  
n'observe aucune accumulation au bout d'une heure d'induction. La forme assemblée  
migre à la même taille que la phytase purifiée native, mais la protéine résultante ne  
montre aucune activité de phosphatase. Ceci suggère ou bien que l'assemblage qui se  
produit dans la bactérie n'est pas correct et aboutit à une protéine non fonctionnelle,  
ou bien qu'une modification post-traductionnelle de la protéine nécessaire qui ne se  
produit pas dans *E. coli* est nécessaire pour l'activité.

#### II.4) Deux gènes phytase sont présents chez le maïs et ils sont localisés sur le chromosome 3

30 Sur les treize clones génomiques isolés et analysés, dix clones positifs sont  
finalement retenus dont sept sont différents. Les inventeurs ont pu établir au moins  
deux classes :

- la classe I qui comprend trois clones différents chevauchants : P3 = P4 (12kb), P19 (13,5 kb), et P22 (16 kb). Les cartes de restriction sont présentées à la Figure 3,
- la classe II qui comprend deux clones chevauchants : P5 = P26 (17 kb) et P13 = P24 (18,5 kb). Les cartes de restriction sont également présentées à la Figure 3.

35 En ce qui concerne les 2 clones restants :

5 - P23 (12,7 kb, Figure 3) présente un seul fragment de taille identique à un des fragments des clones de classe II, fragment qui n'est pas révélé à l'hybridation. Ce clone a finalement été rattaché à cette classe après comparaison des séquences effectuées sur les clones phagiques réalisées avec l'oligonucléotide Phy 8, désigné sur l'ADNc phy S11 à la position 1129 / 1148. Ces dernières se sont retrouvées parfaitement homologues ;

10 - P25 quant à lui ne présente aucun fragment retrouvé chez les autres clones. L'hybridation des blots contenant l'ADN des phages digérés par les différentes enzymes énumérées ci-dessus, avec le fragment P23.7 Hind III de 3 kb (Figure 3), a montré des différences d'intensité des signaux d'hybridations qui concordent avec la classification proposée des fragments génomiques : signal intense pour les clones de la classe II et faible pour ceux de la classe I dont P25 ferait partie. L'appartenance de P25 à cette classe a pu être confirmée par hybridation avec le fragment Eco RI / Sph I du plasmide portant le fragment P19.14 cloné à Sal I / Hind III (Figure 4, EcoRI : site du polylinker du vecteur et Sph I : site du fragment génomique à la position 1794).

15

20

Des réactions de séquences ont été également menées sur les clones phagiques P3, P19 et P22 à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de l'ADNc phytase phy S11. Les résultats des séquences P3 et P22 obtenues avec l'oligonucléotide Phy 8, désigné sur l'ADNc phy S11 à la position 1129 / 1148, indiquent que le fragment Sal I de 6,9 kb commun aux deux clones et homologue à l'ADNc, est adjacent à l'un des deux bras du vecteur phagique, au petit bras pour P3 et au grand bras pour P22. P3, P22 et P19 ont ainsi pu être positionnés les uns par rapport aux autres (Figure 3).

25 Les séquences complètes du clone de classe I, P19.14 (4,7 kb) et du clone de classe II, P23.7 (3 kb) ont été déterminées et sont présentées aux Figures 4 et 5. Les tailles exactes sont 4695 pb pour P19.14 et 2991 pb pour P23.7.

30 Des séquences incomplètes du clone P13.2 (5,5 kb) et P13.6 (2,6 kb) ont montré que le clone phagique dont ils dérivent est certainement chimérique. En effet, on ne trouve pas d'homologie avec les 100 premières pb de l'ADNc phy S11. La présence d'un site Mbo I (enzyme utilisée pour la digestion partielle de l'ADN génomique lors de la construction de la banque Clontech) à cette position semble conforter cette hypothèse (position + 122 de phy S11).

35 Les analyses de restriction et d'hybridation du clone P5, révèlent que ce dernier est aussi chimérique.

5 En ce qui concerne le fragment génomique P19.14 (classe I), la comparaison de la séquence tirée du fragment génomique et de la séquence de l'ADNc phy S11, met en évidence un seul intron de 131 pb dans la région 5' leader non traduite. L'épissage de l'intron se situerait après la 13<sup>ème</sup> base nucléotidique de l'ADNc phy S11. Quelques différences ponctuelles sont observées par rapport à la 10 séquence de phy S11. Ces différences pourraient correspondre à du polymorphisme intervariétal (phy S11 vient de la lignée Mo17 et P19.14 de la lignée B73). La séquence de phy S11 est entièrement retrouvée dans la séquence génomique. Du site Nco I situé au niveau du triplet codant pour la première méthionine, au site Hind III de clonage, 2,1Kb permettent de déterminer la région promotrice de ce gène. Le cadre 15 de lecture ouvert déterminé est le même que celui de phy S11, le codon de terminaison est également TAA. Ce gène coderait donc pour une protéine de 387 acides aminés, identique à celle déduite de l'ADNc phy S11.

La séquence complète du clone P23.7 (fragment Hind III de 3 kb) a été 20 déterminée. D'après l'alignement des séquences de phy S11 et P23.7, le gène phytase cloné dans P23.7 semble plus éloigné de phy S11 que ne l'est P19.14. Les différences observées ne sont toutefois pas très importantes. L'alignement des séquences débute à 25 la première base de l'ADNc phytase et à la base 1174 du fragment génomique séquencé. Un intron de 125 pb est situé dans la région 5' leader non traduite. Une vingtaine de mutations ponctuelles sont observées et on peut noter une plus grande variation entre les séquences au niveau de la région 3' non traduite. Nous avons également observé une addition de deux fois 3 bases dans la région 5' traduite. Le cadre de lecture ouvert demeure ainsi le même que celui de phy S11 et le codon stop 30 est également TAA. Le gène cloné dans P23.7 coderait pour une protéine de 389 acides aminés.

La comparaison des séquences génomiques de P19.14 et P23.7 en amont et en aval de la région transcrive de ces deux gènes phytase montre que ces séquences étaient totalement différentes.

35 L'interrogation des banques de données en utilisant la séquence phy S11 et le logiciel de comparaison FastA avait montré l'existence d'un EST de maïs de 162 pb, n° d'accession T20338, fortement homologue. Celui-ci provient d'une banque d'ADNc obtenue à partir d'ARNm de plantules étiolées de 10 jours de la lignée B73. Il se révèle complètement homologue au début de transcription du gène phytase de

5 classe II (P23.7). On peut noter en particulier, la présence des deux acides aminés supplémentaires.

10 Les séquences protéiques déduites des parties codantes de P19.14 (classe I), P23.7 (classe II) et phy S11 ont été comparées grâce au logiciel d'alignement "clustal V multiple séquence alignement" (Figure 6). Cette analyse a permis de confirmer l'appartenance des protéines codées par P19.14 et P 23.7 à des classes 15 différentes dénommées ci-après respectivement phytase de classe I et phytase de classe II. L'analyse du cadre de lecture ouvert de P19.14 et de phy S11 montre que les deux protéines se distinguent uniquement pour deux acides aminés (on trouve une Alanine et une Valine pour phy S11, et une Glycine et une Isoleucine respectivement pour P19.14).

En conclusion, ces résultats semblent indiquer que les fragments génomiques de classe I correspondent à l'ADNc phy S11.

20 Toutes ces données attestent donc de la présence de deux gènes phytase transcriptionnellement actifs dans la plantule de maïs en germination. Les séquences protéiques de ces deux phytases sont quasiment identiques.

25 Parallèlement, les résultats de cartographie génétique (cf. matériels et procédés) semblent indiquer l'existence de deux loci présentant des homologies de séquence avec l'ADNc phytase phy S11. Le traitement des données avec le logiciel de cartographie Mapmaker version 2.0 pour Macintosh (Lander *et al.* 1987, Genomics 1 : 174-181) a montré que ces deux loci dénommés *phy I* et *phy II* sont très liés, positionnés à 1 cm l'un de l'autre sur le chromosome 3 du maïs. Ils sont encadrés par les loci *umc010* et *umc026* (MNL 69 : p 249). *Phy I* est à environ 4,6 cm du locus *umc010* du côté du bras court du chromosome et *phy II*, positionné au même endroit que *bml 06.06*, est distant de 4,2 cm du marqueur *umc026*.

30 Une hybridation complémentaire a été réalisée sur les membranes contenant l'ADN digéré des lignées recombinantes afin d'établir la correspondance entre ces deux loci et les gènes de classes I et II caractérisées à partir des fragments génomiques. Pour ce faire, le fragment Eco RI / Sph I spécifique de la séquence en amont du gène de classe I (P19.14) a été utilisé comme sonde. Les résultats des 35 hybridations démontrent que le gène de classe I correspond au locus *phy I*.

### **II.5) Détermination du départ de transcription et des régions promotrices des gènes phytase**

#### **II.5a) Cartographie des départs de transcription**

5 Pour déterminer les départs de transcription des gènes phytase, nous avons utilisé la méthode 5'RACE.

10 Plusieurs combinaisons d'oligonucléotides ont été testées : AP1 et AP2 (Kit Marathon) / phy 20 (position + 95 / + 75 de phy S11) ; AP1 et AP2 / phy 18 (position + 294 / + 273 de phy S11). Les produits d'amplification obtenus dans les conditions suivantes : 1 min 94°C ; 40 cycles (30 sec 94°C, 30 sec 55°C, 2 min 68°C), n'ont pu être détectés par coloration au bromure d'éthidium après migration sur gel d'agarose à 2 %. Leur mise en évidence a été réalisée par hybridation avec la sonde ADNc phy S11 (EcoR I / Not I). Les produits positifs ont alors été clonés dans le vecteur plasmidique pGEM-T (Promega) selon les recommandations du fournisseur, puis séquencés. Différents produits, que l'on peut classer en deux groupes, se sont révélés informatifs :

15

- le clone n° 53 (obtenu à partir de l'oligonucléotide phy 18), beaucoup plus court que le produit minimal attendu défini par la séquence de l'ADNc phy S11, semble mettre en évidence la présence d'une structure secondaire forte en 5' de l'ARN messager, qui empêcherait une bonne activité de la réverse transcriptase. La réverse transcriptase a été stoppée à la position + 245 de phy S11 ;
- les clones n° 92, 93 et 87 (obtenus à partir de l'oligonucléotide phy 20), de taille sensiblement équivalente à la taille du fragment attendue à partir de l'ADNc phy S11. On a pu noter un arrêt de la réverse transcriptase à 10 pb en amont du début de l'ADNc pour le n° 92, à la position + 19 pour le n° 93, + 54 pour le n° 87. La séquence du clone n° 92 présente 100 % d'homologie avec la séquence déterminée pour le fragment P23.7 et également avec l'EST de maïs, n° d'accession T20338. Le départ de transcription se situe à la position 1261 de la séquence génomique déterminée sur P23.7 ou légèrement en amont.

20

25

30

35

Les expériences visant à mettre en évidence les départs de transcription des différents gènes phytase se sont donc révélées fructueuses pour le gène phytase de classe II. L'isolement de l'ADNc phy S11 atteste que l'initiation de la transcription du gène de classe I a lieu à la position 1935 de la séquence génomique ou légèrement en amont (Figure 4 ou SEQ ID N° 2).

Pour les deux gènes on constate la présence d'une boîte TATA à environ 60 à 70 pb en amont des transcrits trouvés.

#### II.5b) Expression transitoire

5 Afin d'étudier la spécificité des promoteurs des deux gènes phytase (classes I et II) vis-à-vis des différents tissus de grains de maïs en germination, trois constructions plasmidiques ont été réalisées. Il s'agit de fusions traductionnelles au niveau du codon d'initiation avec le gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -glucuronidase (Jefferson, 1987, Plant Mol. Report 5 : 387-405).

10 En ce qui concerne l'étude de la région promotrice du gène de classe I, deux fragments génomiques du plasmide P19.14 ont été fusionnés au gène GUS pour analyser l'expression transitoire de la  $\beta$ -glucuronidase. Un fragment long de 2,1 kb et un fragment plus court de 1,3 kb. Pour le gène de classe II, un fragment de 1,3 kb a été fusionné (cf. matériels et procédés).

15 Après bombardement de grains en germination (cf. matériels et procédés), une expression transitoire faible (un à deux spots visibles par embryon) a pu être ainsi détectée au niveau du noeud cotylédonnaire d'embryons bombardés un jour après la mise en germination avec les construits suivants :

- pBIOS 261 (fragment promoteur de 2,1 kb de classe I)
- pBIOS 262 (fragment promoteur de 1,3 kb de classe II).

Aucune expression n'a été décelée dans le scutellum ni dans la couche d'aleurone pour ces construits. Aucune expression n'a été constatée dans aucun tissu avec le fragment promoteur court du gène de classe I (pBIOS 255).

25 Nous avons donc déterminé qu'au moins un fragment de chaque gène phytase (2,1 kb amont du codon start pour la classe I et 1,3 kb amont du codon start pour la classe II), peut conférer une expression transcriptionnelle dans certains tissus de la plantule de maïs. Ces fragments promoteurs des deux gènes phytase (contenant aussi les leaders avec leur unique intron) peuvent être utilisés pour toutes modifications biotechnologiques de diverses plantes

30 Les données sur la régulation des gènes phytase laissent penser qu'ils ne sont transcriptionnellement actifs qu'au moment de la phase germinative. Nous disposons donc de promoteurs qui ont toutes les chances d'être spécifiques de cette étape clef du développement de la plante et de son rendement.

35 Chez le maïs, ils peuvent par exemple être utiles pour diriger la production d'un peptide antifongique afin d'augmenter la résistance de la plante aux champignons particulièrement lors de l'étape de germination. D'autres applications comme l'augmentation de la vigueur de germination peuvent être préférentiellement envisagées via l'accroissement de la production de certaines hormones comme par

5 exemple les cytokinines et les gibbéréllines. Ceci peut être obtenu par l'expression d'enzymes de biosynthèse de ces hormones.

**II.6) Expression ectopique de la phytase de classe I dans le maïs pour améliorer la digestibilité du phosphore et augmenter l'efficacité d'extraction de l'amidon de grain de maïs**

10 Afin d'augmenter la digestibilité du phosphore du grain de maïs et/ou d'améliorer l'extraction de l'amidon durant l'étape industrielle du trempage, nous avons adopté plusieurs stratégies utilisant toutes une expression ectopique de la phytase de classe I.

**II.6a) Expression constitutive dans le cytoplasme**

15 La première consiste à diminuer directement la quantité d'acide phytique produite dans l'embryon de maïs. Il est connu que certains mutants de maïs, *low phytic acid 1* et *2* peuvent avoir une réduction de leur teneur en acide phytique pouvant atteindre 33 % de la quantité totale sans voir une diminution de leur contenu en phosphore total (Raboy *et al.*, 37<sup>th</sup> Annual Maize Genetics Conference 1995, Asilomar : Asbtract p. 6). Nous avons aussi choisi de produire la phytase de classe I dans toute la plante via l'utilisation de promoteurs constitutifs et ceci afin qu'elle hydrolyse l'acide phytique en cours de production dans l'embryon. Comme il semble que l'acide phytique soit nécessaire au cours du développement de l'embryon - en effet Raboy *et al.* (37<sup>th</sup> Annual Maize Genetics Conference 1995, Asilomar . Asbstrac p. 6) ont isolé des allèles du mutant *lpa 1* qui sont léthaux, ces derniers n'ont plus du tout d'acide phytique - nous avons testé tout d'abord un promoteur d'expression constitutive faible chez le maïs, le promoteur 35S (Guilley *et al.* 1982, Cell 30 : 763-773). Parallèlement l'utilisation d'un promoteur fort, le promoteur associé au premier intron du gène Actine 1 de riz (Mc Elroy *et al.* 1991, M.G.G. 231 : 30 150-160) a été développée. Ces promoteurs dirigeront pour cette stratégie l'expression de la phytase de classe I telle qu'elle est naturellement exprimée au cours de la germination, c'est-à-dire qu'elle sera produite dans le cytoplasme de toutes les cellules de la plante (PHYT I).

**II.6b) Expression dans un compartiment cellulaire et/ou un tissu différent de celui contenant l'acide phytique**

35 Dans une autre stratégie, nous visons à produire ectopiquement de la phytase de classe I dans le grain de maïs sec de manière à ce qu'elle n'interfère pas avec l'acide phytique produit dans le germe au cours de la maturation du grain. Cette

5 stratégies vise à optimiser la croissance des plantes selon l'invention. Le but est de procéder de telle manière que la phytase ne soit pas dans le même compartiment que la phytine, et de ce fait n'exercera son activité qu'au moment où les grains seront broyés et ingérés par l'animal ou lors de l'opération de trempage, première étape industrielle de l'extraction de l'amidon.

10 Pour cette deuxième stratégie, nous utilisons deux approches différentes qui peuvent être combinées pour en faire une troisième.

#### **II.6b1) Expression cytoplasmique dans l'albumen**

15 La première consiste à tirer partie de la morphologie du grain de maïs en exprimant la phytase de classe I de type cytoplasmique (PHYT I) dans le compartiment qui ne contient pas d'acide phytique, c'est-à-dire dans l'albumen. Ce compartiment tissulaire est très volumineux et peut permettre l'expression d'une grande quantité de phytase. Des promoteurs d'expression spécifique de ce tissu sont connus et nous avons choisi d'utiliser 2 promoteurs de gènes codant pour des protéines de réserves de céréales : le premier vient du gène de  $\gamma$ -zéine de maïs (Reina *et al.* 1990, N.A.R. 18 : 6425-6426) le deuxième vient du gène d'une protéine de réserve du blé, la "High Molecular Weight Glutenin" (Robert *et al.* 1989, The Plant Cell 1 : 569-578).

#### **II.6b2) Expression constitutive dans l'espace extracellulaire**

20 La deuxième approche est semblable à la réalisation utilisant une phytase fongique (Pen *et al.* 1993, Biotechnology 11 : 811-814 et brevet d'invention de Pen *et al.* n° EP-0 449 375) chez le tabac et le colza via l'expression dans un compartiment cellulaire différent de celui où se trouve l'acide phytique. Le compartiment choisi étant l'espace extracellulaire. Pour cela on rajoute un signal d'adressage extracellulaire au début de la protéine phytase de classe I via une fusion en phase, pour donner une nouvelle protéine (Sec-PHYT I). Les signaux d'adressage qui permettent un transit via le réticulum endoplasmique puis l'appareil de golgi pour terminer dans les vésicules excrétrices sont bien connus de l'homme de l'art. Ils sont de plus clivés lors de la maturation de la protéine ; ceci garantit la production d'une protéine quasiment identique à la phytase originelle. Pour cette réalisation, nous avons choisi le peptide transit d'une "Pathogenesis Related Protein", la thaumatin du tabac (Cornelissen *et al.* 1986, Nature 321 : 531-532). Ce peptide a été utilisé avec succès pour la production d'albumine du sérum humain (Sijmons *et al.* 1990, Biotechnology 8 : 217-221) et pour la production de phytase d'*Aspergillus* (Pen *et al.* 1993,

5 Biotechnology 11 : 811-814). Des promoteurs constitutifs peuvent être bien évidemment utilisés comme dans la réalisation de Pen *et al.* (1993, Biotechnology 11 : 811-814). Nous avons choisi le promoteur fort déjà mentionné : Actine de riz avec son premier intron.

#### **II.6b3) Expression extracellulaire dans l'albumen**

10 Prenant en compte l'opportunité que le maïs et les céréales en général ont un albumen développé, on peut combiner les deux approches précédentes à savoir : utiliser des promoteurs spécifiques de l'albumen pour exprimer la phytase excrétée (Sec-PHYT I). Les mêmes promoteurs que ceux utilisés pour l'expression de la phytase cytoplasmique, ont été choisis. Cette troisième approche garantit un fort taux 15 d'expression de la phytase dans le grain de maïs assurant son absence d'expression dans le germe riche en acide phytique.

15 L'expression ectopique de PHYT I et de Sec-PHYT I est détectée dans les différents organes des maïs transgéniques par la méthode Western.

#### **II.7) Analyse de l'expression spatio-temporelle du cDNA phy S11 au cours de la germination et de la croissance de la plantule**

##### **II.7a) Expression de la phytase au niveau du coléorhize de la racine et du coléoptile.**

20 Il est intéressant d'observer l'expression phytasique, et plus particulièrement, son expression dans certains organes de la plante et/ou à certaines étapes du développement de la plante.

25 Une première analyse a été réalisée par Northern blots sur des RNAs totaux extraits à divers stades du développement (1, 2, 4 et 7 jours) de différentes parties de la jeune plantule (coléoptile, feuille, scutellum, coléorhize et racine). Les résultats des Northerns montrent une accumulation importante du mRNA phytase à 1 jour dans le coléorhize, la racine et le coléoptile. Le signal d'hybridation diminue ensuite dans la racine au cours des stades suivants (2, 4 et 7 jours). Il continue à augmenter dans le coléoptile au moins jusqu'au stade 4 jours.

30 Des Northerns ont également été réalisés sur les RNAs totaux extraits de feuilles ou de racines de plantes adultes (1 mois). Alors qu'aucune hybridation avec l'ADNc phytase n'est observée dans le cas des RNAs de feuilles, un signal faible

5 mais significatif est observé avec les RNAs provenant de racines: la présence de mRNA phytase est donc détectée dans les transcrits provenant de racines adultes, à un stade très postérieur à la germination.

10 Des hybridations *in situ* réalisées sur les embryons à 1 jour, mettent également en évidence une accumulation importante du mRNA phytase au niveau du coléoptile et de la racine. De plus par immunolocalisation sur des coupes au même stade on a pu localiser la protéine phytase au même endroit que son mRNA.

### II.7b) Expression de la phytase au niveau de l'endoderme et du péricycle racinaires

15 La présence de mRNA phytase dans les RNAs totaux de racine adulte a conduit à se poser la question de la localisation cellulaire de ce transcrit dans les racines.

20 Des hybridations *in situ* sur coupes transversales (4, 8 ou 14 jours) ont montré que les transcrits phytases sont localisés essentiellement au niveau de deux assises cellulaires entourant le cylindre central: l'endoderme et le péricycle. On en détecte également au niveau de l'épiderme. La phytase révélée par immunolocalisation se situe au niveau des mêmes assises cellulaires. L'ensemble de ces données montrent donc une expression très localisée de la phytase au niveau des racines portant à la fois sur le messager, la protéine et l'activité enzymatique.

25 L'endoderme est connu pour constituer une barrière physiologique importante : c'est au niveau de cette assise cellulaire que se produit la régulation du transport sélectif des minéraux vers le cylindre central et par la suite vers les parties aériennes de la plante. Ces résultats amènent à penser que la phytine observée dans les cellules de ces assises (Van Steveninck et al., 1993) et son hydrolyse par la phytase pourrait jouer un rôle important dans la régulation des flux de phosphate et de cations 30 vers les parties aériennes.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'un des deux gènes phytase s'exprime préférentiellement au cours de la germination dans l'embryon, coléoptile et racine, et est impliqué dans la mobilisation de la phytine stockée dans le germe.

5 L'autre gène est plutôt spécifique de la racine (épiderme, endoderme et/ ou péricycle) et est régulé de façon distincte pour contrôler l'homéostasie du phosphate et des cations dans la plante. C'est ce que démontre l'exemple suivant.

#### II.8) Discrimination des transcrits de classe I et II par RT-PCR

10 La forte homologie observée entre les séquences transcrtes des deux gènes de classe I et II ne permet pas de produire des sondes spécifiques de l'un ou l'autre gène. Il est donc difficile à l'aide de telles sondes de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'un des deux gènes serait spécifique de la germination et l'autre des racines.

15 Cependant, la comparaison des séquences codantes des 2 gènes de classe I et II montre la présence de 2 codons supplémentaires en 5' du gène de classe II codant pour deux acides aminés supplémentaires (acides aminés 7 et 25 de la protéine codée par le gène de classe II, Figure 6).

20 Mettant à profit la différence résultant de la présence du premier codon supplémentaire, deux oligonucléotides (20-mères), A (SEQ ID N° 4) spécifique du gène de classe I et B (SEQ ID N° 5) spécifique du gène de classe II ont été synthétisés. Ces oligos débutent au niveau de l'ATG et se terminent pour B sur le premier codon supplémentaire et pour A sur le codon suivant. Deux autres oligos communs aux deux gènes ont également été synthétisés : l'un C (SEQ ID N° 6) situé à environ 200 pb en aval des 2 premiers, l'autre D (SEQ ID N° 7) situé à environ 300 pb en aval de C.

25 L'oligo D permet en présence de réverse transcriptase et d'une population de RNAs totaux de synthétiser par réverse transcription les brins de cDNA complémentaires des mRNAs phytase. Ces cDNAs sont ensuite utilisés pour réaliser des amplifications par PCR en présence soit du couple d'oligo A+C, soit du couple B+C.

30 Des contrôles ont montré que la combinaison A+C amplifiait bien spécifiquement la région correspondante du plasmide contenant le gène I, tandis que la combinaison B+C amplifiait spécifiquement le cDNA correspondant au plasmide de classe II.

De plus il a été montré qu'il existait une proportionnalité entre la quantité de

5 plasmide utilisée pour la PCR et l'amplification obtenue.

Les RNAs extraits des différentes parties de la plantule à des stades distincts ont été ainsi testés par RT-PCR. Les premiers résultats réalisés sur des RNAs extraits à 4 jours, montrent que dans le coléoptile seul le gène de classe I est abondamment exprimé. Dans les RNAs provenant de la racine, les deux gènes I et II sont exprimés de façon à peu près identique.  
10

15 D'après ces résultats, le promoteur du gène I contrôle l'expression de la phytase dans les organes embryonnaires (coléoptile, coléorhize, racine embryonnaire) et régule la mobilisation de la phytine stockée dans l'embryon. De son côté, le promoteur du gène II est spécifique des assises cellulaires racinaires impliquées dans le contrôle de l'homéostasie des minéraux dans la plante.  
20

### **II.9) Analyse de l'expression ectopique de la phytase dans les maïs transgéniques : protéine, activité enzymatique et niveau d'expression**

#### **II.9a) Mise en évidence de l'expression ectopique d'une phytase conforme**

20 L'analyse des transformants primaires a été réalisée tout d'abord par analyse Western des protéines isolées de feuilles de plantes acclimatées en serre et de graines sèches obtenues après croisement avec du pollen d'une variété élite non transformée. Dans ce dernier cas, 6 graines sont broyées simultanément, ceci afin de maximiser les chances d'en avoir au moins une contenant le transgène (en théorie 50 25 % au moins portent le transgène).  
25

30 Les extractions et les westerns ont été réalisés comme décrit dans Labouré et al., Biochem. J., 1993, 295, 413-419 avec la modification suivante : avant l'électrophorèse, les protéines ont été précipitées au TCA 10 %, lavées 2 fois à l'acétone 80 % avant d'être reprises dans le tampon de dépôt ; des produits non protéiques réagissant avec l'anticorps ont en effet été trouvés notamment dans les extraits de feuilles. Ces produits ont été éliminés par cette précipitation.  
35

Pour les différents gènes chimériques, nous avons pu mettre en évidence l'expression d'une protéine réagissant spécifiquement avec les anticorps anti Phytase et qui comigrait avec la phytase détectable dans des extraits de germinations agées de

5 5 - 6 jours de maïs non transgénique. L'expression dans les feuilles était détectable uniquement avec les gènes portés par les plasmides pBIOS 259, pBIOS 264 et pBIOS 268 bis ; ceci était attendu car les promoteurs utilisés sont constitutifs. Une expression dans les graines a aussi été visualisée sur la majorité des transformants exprimant au niveau des feuilles. La taille de la Phytase ectopique exprimée par le construct 10 constitutif excréteur : gène Sec -Phyt I, est identique à celle de la Phytase détectée pendant la germination. Ceci indique que la maturation s'effectue bien à l'endroit attendu juste après le signal d'adressage PR-S.

15 Pour les transformants ayant intégré les gènes à expression spécifique dans l'albumen, comme attendu aucune expression n'a été mise en évidence dans les feuilles. Dans les graines, nous avons obtenus pour certains transformants une expression ectopique très forte qui était supérieure à la quantité normalement présente dans des extraits de germinations agées de 6 jours.

20 Sur la base des résultats western, nous obtenons des taux d'expression qui varient dans les feuilles entre 0,005 % et 0,3 % des protéines totales solubles. Dans les graines, la phytase ectopique varie de 0,03 % à 1 % des protéines totales solubles.

#### **II.9b) Activité Phytasique dans les feuilles et graines de maïs transgéniques**

25 La détection par western de phytase ectopique ne suffisait pas pour affirmer que nous avions réussi à avoir une protéine capable d'hydrolyser l'acide phytique car des modifications posttraductionnelles peuvent influer sur l'activité de la protéine. Aussi, nous avons dosé l'activité phytasique des extraits transgéniques 30 comparativement à des extraits issus de germinations agées de 5 à 6 jours. Cinq transformants positifs en western ont été analysés : 3 au niveau feuille et 2 au niveau graine. Les résultats sont donnés ci-dessous en nmoles de phosphate inorganique libérées en 1 heure à 55°C et par mg de protéines.

#### **Extraits**

#### **Activité Phytasique**

**(nmoles Pi / h / mg de prot.)**

5

	Germinations 5 jours (Maïs non transformé)	3 500
	Feuilles (pBIOS 264) événement 2D	1 950
	Feuilles (pBIOS 264) événement 2H	1 800
	Feuilles (pBIOS 259) événement 2A	1 000
10	Graines sèches (pBIOS 258) événement 1J	3 050
	Graines sèches (pBIOS 258) événement 1F	3 600

15 Ces résultats démontrent que la phytase produite selon l'invention est active biologiquement et parfaitement conforme, notamment dans le grain de maïs qui sert de base à l'alimentation des monogastriques, alors qu'il est connu que le maïs non transformé (grains et feuilles) possède une activité phytase déficiente et pratiquement indéetectable.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: BIOCÉM  
(B) RUE: 24 AVENUE DES LANDAIS  
(C) VILLE: AUBIERE  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 63170

(A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
(INRA)  
(B) RUE: 147 RUE DE L'UNIVERSITE  
(C) VILLE: PARIS  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 75007

## (ii) TITRE DE L' INVENTION: PHYTASES DE PLANTES ET APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES

## (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 15

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

(A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 9609734  
(B) DATE DE DEPOT: 01-AUG-1996

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1335 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: ADNc de la phytase de maïs

## (ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 32..1192

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATCCATCCTT ATTGAGCTTA GTGTTGATC C ATG GAC TCG GAA GGA GTA GCA  
Met Asp Ser Glu Gly Val Ala  
1 5

GCA AAG GTG GCA GAT GAG ACT ACT AAA CCG GCA AGC CAA GAA GAC GGC Ala Lys Val Ala Asp Glu Thr Thr Lys Pro Ala Ser Gln Glu Asp Gly 10 15 20	100
GAG AGC AAG GCC GGG ATG ACT GAT CTG CTG ATG CTG ACC GAC AAG TCG Glu Ser Lys Ala Gly Met Thr Asp Leu Leu Met Leu Thr Asp Lys Ser 25 30 35	148
CAG CTG CAG GCG CTA GCG ATG CTG CTG CGG AAC AAC GAG GAG CTC ATG Gln Leu Gln Ala Leu Ala Met Leu Leu Arg Asn Asn Glu Glu Leu Met 40 45 50 55	196
ATG AGC CAA GCG ATC AAG TCG GAG ACG GAG CGC GTT GAG TAC CTC AAG Met Ser Gln Ala Ile Lys Ser Glu Thr Glu Arg Val Glu Tyr Leu Lys 60 65 70	244
ACG GTG AGC GAC TGC TAC ACG CGG ACA ATG AAG CTC CTT GAC GAC TCC Thr Val Ser Asp Cys Tyr Thr Arg Thr Met Lys Leu Leu Asp Asp Ser 75 80 85	292
ATG GCC GCC AGG ATC ACG TAC GAG CGT TCG GGC GGA ACG AGG AGC CTC Met Ala Ala Arg Ile Thr Tyr Glu Arg Ser Gly Gly Thr Arg Ser Leu 90 95 100	340
GTC GCC CGG GAC ATG GAC TAC GTC GTC TAC GTC GGC CTC AAC GCG TGC Val Ala Arg Asp Met Asp Asp Tyr Val Val Tyr Gly Leu Asn Ala Cys 105 110 115	388
TTG CAG AAC GTC CGC AAC TGC TGC GTG CGT CTG GAC GCC ATC GAC AAG Leu Gln Asn Val Arg Asn Cys Cys Val Arg Leu Asp Ala Ile Asp Lys 120 125 130 135	436
CTG CGG GCG CAC TAC GAC GCC CTC GCC GAC GCC GTC GCC GAA CCG GCC Leu Arg Ala His Tyr Asp Ala Leu Ala Asp Ala Val Ala Glu Pro Ala 140 145 150	484
GCC AAC GTC GAG GGC CTC GCC GCG GAG GCG TCC GAG TAC AAG GCC GCC Ala Asn Val Glu Gly Leu Ala Ala Glu Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Ala 155 160 165	532
ATG TGG CAG TAC TGC TAC AAC CAG CGG AGC GCC TCC GCG CGG GCG CAC Met Trp Gln Tyr Cys Tyr Asn Gln Arg Ser Ala Ser Ala Arg Ala His 170 175 180	580
TCC CGC GCC TAC TCC CAG GCG CTC AAG CTG GAG GGC ATC GAC TTC GCC Ser Arg Ala Tyr Ser Gln Ala Leu Lys Leu Glu Gly Ile Asp Phe Ala 185 190 195	628
GAG CTT GTG CGG AGG CAC CAG CTC CGG CTC GGG TAC GGC AGC AAG GGC Glu Leu Val Arg Arg His Gln Leu Arg Leu Gly Tyr Gly Ser Lys Gly 200 205 210 215	676
GAG GAG TTC GAG GAC CTG GAC ACC CAG AAG CTG GAG GTG TAC AAC Glu Glu Phe Glu Asp Leu Asp Asp Thr Gln Lys Leu Glu Val Tyr Asn 220 225 230	724
AGC ATC ATC GTC GAG TCG GGG CGG GGG CTA CCG GTG CGG ATG TTC Ser Ile Ile Val Glu Ser Gly Arg Ala Gly Leu Pro Val Arg Met Phe 235 240 245	772

TCA TCG GGC CGC TCT GCC GGT GGC CCT AAG ATT GCA GCC ACG ACG TGG	820
Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Pro Lys Ile Ala Ala Thr Thr Trp	
250 255 260	
GCG CAG GCG GTG AGC GTC TTC ATC ATG GCG GCG GGC AAC CTG GCG TGG	868
Ala Gln Ala Val Ser Val Phe Ile "et Ala Ala Gly Asn Leu Ala Trp	
265 270 275	
GAC GTG TTC ACC ACG GAG CAC GAG GTG GAG GCC ATC CTC AAG GGC AGC	916
Asp Val Phe Thr Thr Glu His Glu Val Glu Ala Ile Leu Lys Gly Ser	
280 285 290 295	
CTC AAC CTC CTG GCG GGG CTA GGG GGC TTC GCC GTG GAG GCC GTC GTC	964
Leu Asn Leu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Val Glu Ala Val Val	
300 305 310	
GGC GCG GCT GTC ACC AAG GCG GTC CCA AAC GTC GCC GCC GGC GTC TTT	1012
Gly Ala Ala Val Thr Lys Ala Val Ala Asn Val Ala Ala Gly Val Phe	
315 320 325	
GCT TGC TCT CTC GCG GGC TTC GTC GTG GGC GCC ATC GCC GGG CTG ATC	1060
Ala Cys Ser Leu Ala Gly Phe Val Val Gly Ala Ile Ala Gly Leu Ile	
330 335 340	
TTC GTC GGC GTC AGC GGC CTC CTC ATT AAC CTC ATC ATC GGC TCC CCT	1108
Phe Val Gly Val Ser Gly Leu Leu Ile Asn Leu Ile Ile Gly Ser Pro	
345 350 355	
AGG AAG GTG CCT GAC ATG AGC AAG CTC ATG TTC CAC ACC GCC GTC ATG	1156
Arg Lys Val Pro Asp Met Ser Lys Leu Met Phe His Thr Ala Val Met	
360 365 370 375	
CCC GAT GGA ATG GCC CTT GCG TAT GCG GTA TCT CAT TAATTACTTA	1202
Pro Asp Gly Met Ala Leu Ala Tyr Ala Val Ser His	
380 385	
TTATCATCGC AGTCACTACC AATGCAACTG CTTCAAGATCC TACTGTTGGA ACGCGTGTGG	1262
AAATAATAAA GCAATAATAA TAATTATTAT TGTAATAACA ATAATTATGA TATATTGATA	1322
ATGATTATAT ATC	1335

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 4695 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: clone classe I / P19.14

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 2097..3260

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AAGCTTCTG	AAAAAGTCCA	ATCACTAAAA	TTGAGTCAG	AGTAAAAACT	TATGGCATT	60
TCGTGAAGC	TGGTTGTGCA	GCGGCAATGC	GACACGGATG	AGCGGCAGCA	TAGGGCCTGT	120
ATAGCCCCAA	ACAGCTAGTT	TTAACCCCAA	CGACTAGTT	TGTTGGGT	TATATTACA	180
CATCCCACGC	CCTGGGTCC	TGCTGGTGT	TAGAATAGTT	CAAACATC	CCAAACCATA	240
TTTAAGCCCT	CTCTAATTCC	TCTATTATG	GGAGCGTGT	ACTAGTGT	TGTTACGGTT	300
AAAGAACTGA	TTAAGAGCTA	GAGAGCAGAT	CTAGAGCAAG	ACAACCTTGA	GCACCTGTCA	360
GGCTTCGTCA	ACATTCAATTG	CACACTCATT	ACTCTGGAG	GGGAAGCCTC	CTCAACGGCT	420
AGGCGTCCCC	CGGTGATCTC	CCATGCTTGT	TGTGAACCGC	AGGAAAGTCT	GTAATTACCC	480
CATATCTTAG	TGAAAAAAACC	AGCTCAGTAT	TTTGGTGGTG	AGTGAAACA	GACTCCTTT	540
AGCTTCCTCA	ACAACATGGA	CTTAGACATA	GCCTGACACA	CTCTTATT	GGATATCTCT	600
ACTCCTTAA	AGCACCAAGTT	TCTTGTGTG	TGTGTACGT	GCGAAACTTG	TTAGTCTGTT	660
GCTCTCCCTT	GCATCTTGCC	TGACCATGGA	CCCAATAGGT	TGTTATACCA	TAGATAGGCC	720
ATGATAGACT	ACCCAACGAG	CTCAACCCGA	TAGGAAGCC	CACACAACGC	AACACTCTCA	780
CATAGTACCA	CCTCGCTAGC	GGAAGGGAAC	GAGCGATCGA	GCGAGCTATA	AAAATGTTCA	840
GTCTGTTGT	CATGCCTGGC	GTGCCATAA	TTATTCTTAG	GGTATGTTAG	ATTACTTTAG	900
TCTCGGTATT	AAAGTTAGT	CATTACTCTG	TTTGGTTCA	GAGATTAAAA	ATGTTCATAA	960
CTCACTAAAA	AATTTGTAAG	AAGACCAAAA	TATTCTTAT	CATTCTCTCG	CCACTACTCT	1020
TCTCCCGCGA	CAACGGAAAT	AAATAAGGGG	CAACCATGAA	ATTGACATGT	TTTAGGGGTT	1080
GTTTGAATGC	ACTAGAGCTA	ATAGTTAGTC	AGCTAAAAAT	ATACTAGTAG	AATTAGCTAA	1140
CTAACAAATA	GTTAGCTAAC	GAGTAGCTAA	TTTACTAAAA	ATAGTTAATA	GCTAAACTAT	1200
ATATTAGCTA	TAGGGTGT	GGATGTCCT	AGCTAATT	AGCTAACTAT	TATCTCTAGT	1260
GCATTCAAAT	AACCCCTTAA	TCCCATTAG	TCACTCGAGG	AACTACTATT	TCCGGTGTCT	1320
TATTATTTAT	CGTTTGGAT	AAGGTTGAG	AAAAACTTAT	AAATTTTTA	CTATAAATAA	1380
CTATTTGAT	ATTAGTTGA	AAACCTAATA	CTTATATGCA	TAGTTTGT	TTAAAAAGTA	1440
CTTTTATAAA	AGTATAAAATG	TAATAAGAGT	TTATTGTAT	TTTAGGAAAA	AACATCGGT	1500
AAAGCTATAT	ATATTGGA	GACTATATCG	TTGTCCTAAA	CGACAATAAA	AAGGCACCGA	1560
GAGAGTAGGG	ACTAAAGCGG	TTTAATCTAT	CCTTACTGT	TATTGTTGA	TAATTATGG	1620
ATTAATGAGA	CTAAAATTCT	ATGACTAATC	TTTAGTCCCC	AAACTAAACA	AACCCTTAGT	1680

ATGATTGATC CTGGACAGCA TACAGACCCA TGCTTAACCTT GATACAACAC CAACAAGACC	1740
AGACCCACC CCCTTCCCTA TCAACGGAGG GATGATATAT TATTTAAGTG CATGCGCGTG	1800
CTGCACGCTG TTATGGACCT ATTTGGTAGG ACTAGGAGTA GGATATATAT CACAAAGTTG	1860
TATACTATA AATAGCTCGC TTTGATCATA TGATCTGCTG CCTTATACGA AACATAGCTA	1920
CTCCTACTAC TCAAATCCAT CCTTATTGTA AGTGCGGTCT TATAAGCTAC TACTAGTTAC	1980
AAGCTGGTTT ATACTTAAC ACAAGTAGCA ACGATTGCC TTAGTATATA TGGTTCATAA	2040
TACATAAATA TTGGAACTGA GACAATATAT ATATGCAGGA GCTTAGTGTT TGATCC	2096
ATG GAC TCG GAA GGA GTA GCA GCA AAG GTG GCA GAT GAG ACT ACT AAA Met Asp Ser Glu Gly Val Ala Ala Lys Val Ala Asp Glu Thr Thr Lys	2144
1 5 10 15	
CCG GCA AGC CAA GAA GAC GGC GAG AGC AAG GCC GGG ATG ACT GAT CTG Pro Ala Ser Gln Glu Asp Gly Ser Lys Ala Gly Met Thr Asp Leu	2192
20 25 30	
CTG ATG CTG ACC GAC AAG TCG CAG CTG CAG GCG CTA GCG ATG CTG CTG Leu Met Leu Thr Asp Lys Ser Gin Leu Gln Ala Leu Ala Met Leu Leu	2240
35 40 45	
CGG AAC AAC GAG GAG CTC ATG ATG AGC CAA GCG ATC AAG TCG GAG ACG Arg Asn Asn Glu Glu Leu Met Met Ser Gln Ala Ile Lys Ser Glu Thr	2288
50 55 60	
GAG CGC GTT GAG TAC CTC AAG ACG GTG AGC GAC TGC TAC ACG CGG ACA Glu Arg Val Glu Tyr Leu Lys Thr Val Ser Asp Cys Tyr Thr Arg Thr	2336
65 70 75 80	
ATG AAG CTC CTT GAC GAC TCC ATG GCG GCC AGG ATC ACG TAC GAG CGT Met Lys Leu Leu Asp Asp Ser Met Ala Ala Arg Ile Thr Tyr Glu Arg	2384
85 90 95	
TCG GGC GGA ACG AGG AGC CTC GTC GCC CGG GAC ATG GAC GAC TAC GTC Ser Gly Gly Thr Arg Ser Leu Val Ala Arg Asp Met Asp Asp Tyr Val	2432
100 105 110	
GTC TAC GGC CTC AAC GCG TGC TTG CAG AAC GTC CGC AAC TGC TGC GTG Val Tyr Gly Leu Asn Ala Cys Leu Gln Asn Val Arg Asn Cys Cys Val	2480
115 120 125	
CGT CTG GAC GCC ATC GAC AAG CTG CGG GCG CAC TAC GAC GCC CTC GCC Arg Leu Asp Ala Ile Asp Lys Leu Arg Ala His Tyr Asp Ala Leu Ala	2528
130 135 140	
GAC GCC GTC GCC GAA CCG GCC AAC GTC GAG GGC CTC GCC GCG GAG Asp Ala Val Ala Glu Pro Ala Ala Asn Val Glu Gly Leu Ala Ala Glu	2576
145 150 155 160	
GCG TCC GAG TAC AAG GCC ATG TGG CAG TAC TGC TAC AAC CAG CGG Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Ala Met Trp Gln Tyr Cys Tyr Asn Gln Arg	2624
165 170 175	
AGC GCC TCC GCG CGG GCG CAC TCC CGC GCC TAC TCC CAG GCG CTC AAG Ser Ala Ser Ala Arg Ala His Ser Arg Ala Tyr Ser Gln Ala Leu Lys	2672
180 185 190	

CTG GAG GGC ATC GAC TTC GCC GAG CTT GTG CGG AGG CAC CAG CTC CGG Leu Glu Gly Ile Asp Phe Ala Glu Leu Val Arg Arg His Gln Leu Arg 195 200 205	2720
CTC GGG TAC GGC AGC AAG GGC GAG GAG TTC GAG GAC CTG GAC GAC ACC Leu Gly Tyr Gly Ser Lys Gly Glu Glu Phe Glu Asp Leu Asp Asp Thr 210 215 220	2768
CAG AAG CTG GAG GTG TAC AAC AGC ATC ATC GTC GAG TCG GGG CGG GCG Gln Lys Leu Glu Val Tyr Asn Ser Ile Ile Val Glu Ser Gly Arg Ala 225 230 235 240	2816
GGG CTA CCG GTG CGG ATG TTC TCG TCG GGC CGC TCT GCC GGT GGC CCT Gly Leu Pro Val Arg Met Phe Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Pro 245 250 255	2864
AAG ATT GCA GCC ACG ACG TGG GCG CAG GCG GTG AGC GTC TTC ATC ATG Lys Ile Ala Ala Thr Thr Trp Ala Gln Ala Val Ser Val Phe Ile Met 260 265 270	2912
GCG GCG GGC AAC CTG GCG TGG GAC GTG TTC ACC ACG GAG CAC GAG GTG Ala Ala Gly Asn Leu Ala Trp Asp Val Phe Thr Thr Glu His Glu Val 275 280 285	2960
GAG GCC ATC CTC AAG GGC AGC CTC AAC CTC CTG GCG GGG CTA GGG GGC Glu Ala Ile Leu Lys Gly Ser Leu Asn Leu Leu Ala Gly Leu Gly Gly 290 295 300	3008
TTC GCC GTG GAG GCC GTC GTC GGC GCG GCT GTC ACC AAG GCG GTC GCA Phe Ala Val Glu Ala Val Val Gly Ala Ala Val Thr Lys Ala Val Ala 305 310 315 320	3056
AAC GTC GGC GCC GGC GTC TTT GCT TGC TCT CTC GCG GGC TTC GTC GTG Asn Val Gly Ala Gly Val Phe Ala Cys Ser Leu Ala Gly Phe Val Val 325 330 335	3104
GCC GCC ATA GCC GGG CTG ATC TTC ATC GGC GTC AGC GGC CTC CTC ATT Gly Ala Ile Ala Gly Leu Ile Phe Ile Gly Val Ser Gly Leu Leu Ile 340 345 350	3152
AAC CTC ATC ATC GGC TCC CCT AGG AAG GTG CCT GAC ATG AGC AAG CTC Asn Leu Ile Ile Gly Ser Pro Arg Lys Val Pro Asp Met Ser Lys Leu 355 360 365	3200
ATG TTC CAC ACC GCC GTC ATG CCC GAT GGA ATG GCC CTT GCG TAT GCG Met Phe His Thr Ala Val Met Pro Asp Gly Met Ala Leu Ala Tyr Ala 370 375 380	3248
GTA TCT CAT TAA TTACTTATTA TCATCGCAGT GACTACCGAT GCAACTGCTT Val Ser His *	3300
385	
CAGATCCTAC TGTTGGAACG CGTGTGGAAA TAATAAAGGA ATAATAATAA TTATTATTGT	3360
AATAACAATA ATTATCATAT ATTGATAATG ATTATATATC AAATAGCTTC TCTCGATTG	3420
TCGTGACACA CGTCACATGA GTCCATGGTG TGCCCCGCTT CGCACGACCC ACGACCGGAC	3480
AGACAATTTC AGCTGAGTGT TAAATTTTG TCTCGAGTAC AAATCCACGG GGCAAAGAAA	3540

GGCCATCGAG CAAATCGAAC ATTTATTTAG TGTCAGACAC TCGGTAAAGA AATCAAATT	3600
TTGGTGTGAA CACTAACAA AGAAAAACAA TCAGTAAAAA GGTGGTTAA CTAATATCGG	3660
ATACTTATCA AATAAAAATG CTCGACAAAA AGTGGTTGG CTAGTGTAC CATCAGCAAC	3720
TAATACCACC TAACCACCAT TCTTTGCC GAGTGTCTA CGCGTCACT CGTCAAAGGA	3780
GGCCTCTTG TTTGGTACCA TTTCTAGACT CTAGTTAAAT AGGTATTGC CTAGCGTCAG	3840
CTCAGAATAG GAGGCAAAGA TGCACTTGT GTATTATTAT CTTCTTTAC ACCAACACAAA	3900
GTATTTTTA TTTTTTCTT CTTGCCCTAA AACTTGTCT GCTATATTCC TATAACACCT	3960
AGAACTACAT GTTCAGTTT GGTACATTTC TCAGTGGTT GTAGATTAG TAAATTATT	4020
TTATTTAACT GAATTCTTG AGATAATTCA AATTGAACG GTAAGTCATT CGTATAATGA	4080
AAACATGAAT AGAAAACAGA TGTTCATGTT ACTAAGTATA AGTGAGGTC GTATACAATA	4140
ATAGACCAGA AAATTCGAAC ATTATGTTCA CGAAATATCA CCATGTACAA TTGTTTTAA	4200
ATTGTATAAA AAGCAAACGA AGTTGAAAA ATTATAAAC TTTGGGATG TCATGATATC	4260
ATAAGTGGAG GCTATAATAA AAGGTTGATA AAGTTTCATT AAAGTTGAC ATGTAATATG	4320
GTTACCACCT AATCAATCTC CATATGAAAC AAATCATGAA ACATATTCTG CGATTCTCG	4380
GTGTTAAAC ATTCAATGAAA TCATGTCAAC TTTTATCAC AGCCTCCACA TATAAACTAT	4440
CATGATTTTC TAACTTGTT TGCTTTTAT ATAATTAAA AACGGTTTT TGGACACTAG	4500
GCAAGAGCT TCTTGCCAA GTGTTTTG GACTCTGGC AAAGACAATA GTTGGAAACT	4560
TTTGATTTG AAGACATCTT GTCAATGAAA ACTATGTCTG AATTTTTA AAAATGTAAT	4620
TCAAAATTTC CAAATGACCT CGAATGAAAA AATCACCAAA ATAATAGTTG TAGATCCGTT	4680
GACCTGCAGG TCGAC	4695

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2990 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: clone classe II / P23.7

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1329..2495

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AAGCTTAAAG ATCCCATTGG AAGTTAAACT CTCGGAAAGA GTTGATCGGA TGTTAGACTA	60
ACTTCTGACG GTCGTTGGGG CCCATCGGAA GTTAGCGACG TAGACGTTGT TAGCACCGAA	120
ACTTCTAACCC ATTTTAGTGG CCTCTCGGAA GTTATTGTGC TAACTTCCAA GGGGTCCCAC	180
CGGCTTCTCA AAAGTTAATG TGCTAACTTC AGGCCATTAGTGGCCTCT CGAAATTTAT	240
ATTGAACCAA CATTCAAAAT GTTATTATT TTCAAATTTC ACTATATTTC AATACATCGG	300
GATACCAACC ATCCGGAAAA CAACACTAAC TGCAATAGCA TCTCATCTGT TTCATCACAA	360
TAACACCACA CCTCATAAAAT CTCATCAATT AAACACAATT CCAATATATT TCTTCAAAAT	420
AAGAACTCAA TTAGTCTCAT CTCAACCCAA GACACATCCC AAATGTCTTA CAGGGTTCAC	480
AAGTTCACCT CCCATCTATT TGAACATATAT CTTATATATT AACAAACAAC ATTAGTTAA	540
ATATCATAACA TTTAGTTATG TCTCTTCCT CATTCTTACT CGTAGCCATG ATTTTGTTT	600
AGTTTGCCT CTTCTGCTCT TCAGCAACAG AATAACAAAAA CTGAGTAGAA AATACAACAA	660
AGGGTAAAAAA TAAGGAAAGC GGTAGAACTA ACGGCACCAC TTCAAAATGT CGTAGTTAA	720
ATAATTGAT GTTCATCAAA TACTAAAATT CAAAATTAAA GACCTCTAGA GTATATTTT	780
CTTACAAGCT CCAGTGGTGG CCGTGCCTCG CGTGGCCATA ATCATCCTTA GTATGATTGA	840
TCATGGACAG GGTACAGACC CATGCTTGAC TTGATAAAAC ACCAACAAATA CCAGACCCCA	900
TCCCCTTCCC TATCAACAAAC GGAGGGACGA TGATATATTA TTTAGGTCTT GTTCGGATAC	960
TCTACTATTA TATTCACTCT AAATCATATG TGTTAATACT AGAGTACCTA AACAAAGGTCT	1020
TAAGTGCATG CACGTGCTGC ACGCTGTTAT GGACCTATTA GGTAGTAGTA GGTGAGTAG	1080
GATATATATC ACAAAGTTGT ATACCTATAA ATAGCTCGCT TTGATAACAT GATCTGCTGC	1140
CTTATACGAA ACATAGCTAC CTACTACTCA AGTATCCATC CTTATTGTAA GTGCTCTTAT	1200
AAGCTACTAC TAGTTACAAG CTGGTTTATA TTTAACTACA AGTAGCAACG ATTTGTCTTA	1260
GTATATATGG TTCATAATAC ATATATATTG GAACTGAGAT AATATATGCA GGAGTACAGT	1320
GTGATCC ATG GAC TCG GAA GGA GTT GTA GCA GCA AAG GTG GCA GAT GAG	1370
Met Asp Ser Glu Gly Val Val Ala Ala Lys Val Ala Asp Glu	
1 5 10	
ACT ACT AAA CCG GCA ATC CAA GAA GAC GGC GCC GAG AGC AAG GCC GGG	1418
Thr Thr Lys Pro Ala Ile Gln Glu Asp Gly Ala Glu Ser Lys Ala Gly	
15 20 25 30	
ATG ACT GAT CTG CTG ATG CTG ACC GAC AAG TCG CAG CTG CAG GCG CTG	1466
Met Thr Asp Leu Leu Met Leu Thr Asp Lys Ser Gln Leu Gln Ala Leu	
35 40 45	
CGG ATG CTG CTG CGG AAC AAC GAG GAG CTC ATG ATG AGC CAG GCG ATC	1514
Aia Met Leu Leu Arg Asn Asn Glu Glu Leu Met Met Ser Gln Ala Ile	
50 55 60	

AAG TCG GAG ACG GAG CGC ATT GAG TAC CTC AAG ACG GTG AGC GAC TGC Lys Ser Glu Thr Glu Arg Ile Glu Tyr Leu Lys Thr Val Ser Asp Cys 65 70 75	1562
TAC ACG CGG ACG ATG AAG CTC CTC GAC GAT TCC ATG GCG GCC AGG ACC Tyr Thr Arg Thr Met Lys Leu Leu Asp Asp Ser Met Ala Ala Arg Thr 80 85 90	1610
ACG TAC GAG CGT TCG GGC GGA ACG AGG AGC CTC GTC GCC CGG GAC ATG Thr Tyr Glu Arg Ser Gly Gly Thr Arg Ser Leu Val Ala Arg Asp Met 95 100 105 110	1658
GAC GAC TAC GTC GTC TAC GGC CTC AAC GCG TGC TTG CAG AAC GTC CGC Asp Asp Tyr Val Val Tyr Gly Leu Asn Ala Cys Leu Gln Asn Val Arg 115 120 125	1706
AAC TGC TGC GTG CGC CTG GAC GCC ATC AAC AAG CTG CGG GCG CAC TAC Asn Cys Cys Val Arg Leu Asp Ala Ile Asp Lys Leu Arg Ala His Tyr 130 135 140	1754
GAC GCC CTC GCC GAC GCC GTC GGC GAC CCG GCC AAC GTC GAG GGC Asp Ala Leu Ala Asp Ala Val Ala Asp Pro Ala Ala Asn Val Glu Gly 145 150 155	1802
CTC GCC GCG GAG GCG TCC GAG TAC AAG GCC GGC ATG TGG CAG TAC TGC Leu Ala Ala Glu Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Ala Met Trp Gln Tyr Cys 160 165 170	1850
TAC AAC CAG CGG AGC GCC TCC GCG CGG GCG CAC TCC CGC GCC TAC TCC Tyr Asn Gln Arg Ser Ala Ser Ala Arg Ala His Ser Arg Ala Tyr Ser 175 180 185 190	1898
CAG GCG CTC AAG CTG GAG GGC ATC GAC TTC GCC GAG CTG GTG CGG AGG Gln Ala Leu Lys Leu Glu Gly Ile Asp Phe Ala Glu Leu Val Arg Arg 195 200 205	1946
CAC CAG CTC CGG CTC GGG TAC GGC AGC AAG GGC GAG GAG TTC GAG GAC His Gln Leu Arg Leu Gly Tyr Gly Ser Lys Gly Glu Glu Phe Glu Asp 210 215 220	1994
CTG GAC GAC ACC CAG AAG CTG GAG GTG TAC AAC AGC ATC ATC GTC GAG Leu Asp Asp Thr Gln Lys Leu Glu Val Tyr Asn Ser Ile Ile Val Glu 225 230 235	2042
TCG GGG CGG GCG GGG CTA CCG GTG CGG ATG TTC TCG TCG GGC CGC TCT Ser Gly Arg Ala Gly Leu Pro Val Arg Met Phe Ser Ser Gly Arg Ser 240 245 250	2090
GCC GGT GGC CCT AAG ATT GCA GCC ACG ACG TGG GCG GAG GCG GTG AGC Ala Gly Gly Pro Lys Ile Ala Ala Thr Thr Trp Ala Glu Ala Val Ser 255 260 265 270	2138
GTC TTC ATC ATG GCG GCG AAC CTG GCG TGG GAC GTG TTC ACC ACG Val Phe Ile Met Ala Ala Gly Asn Leu Ala Trp Asp Val Phe Thr Thr 275 280 285	2186
GAG CAC GAG GTG GAG GCC ATC CTC AAG GGC AGC CTC AAC CTC CTG GCG Glu His Glu Val Glu Ala Ile Leu Lys Gly Ser Leu Asn Leu Leu Ala 290 295 300	2234
GGG CTA GGG GGC TTC GCC GTG GAG GCC GTC GTC GGC GCG GCT GTC ACC	2282

Gly	Leu	Gly	Gly	Phe	Ala	Val	Glu	Ala	Val	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Thr	
305							310				315					
AAG	GCG	GTC	GCA	AAC	GTC	GGC	GCC	GGC	GTC	TTT	GCT	TGC	TCT	CTC	GCC	2330
Lys																
320							325					330				
GGC	TTC	GTC	GTG	GGC	GCC	ATC	GCC	GGG	CTG	ATC	TTC	GTC	GGC	GTC	AGC	2378
Gly	Phe	Val	Val	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Leu	Ile	Phe	Val	Gly	Val	Ser	
335							340			345			350			
GGC	CTC	CTC	ATT	AAC	CTC	ATC	ATC	GGC	TCC	CCA	AGG	AAG	GTG	CCT	GAC	2426
Gly	Leu	Leu	Ile	Asn	Leu	Ile	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg	Lys	Val	Pro	Asp	
355							360					365				
ATG	AGC	AAG	CTC	ATG	TTC	CAC	ACC	GCC	GTC	ATG	CCC	GAT	GGA	ATG	GCC	2474
Met	Ser	Lys	Leu	Met	Phe	His	Thr	Ala	Val	Met	Pro	Asp	Gly	Met	Ala	
370							375					380				
CTT	GCG	TAT	GCG	GTA	TCT	CAT	TAATTACTTA	ATATCATCGC	AGTGACTACC							2525
Leu	Ala	Tyr	Ala	Val	Ser	His										
385																
AATGCAACTG	CTTCAGCTCC	TACTGTTGCA	ACCGCGGTGT	GGAAATAAGA	AGGAAATAAT											2585
AATAATTATT	ATTATTGTAA	TAAAAAATAA	TTATCATATA	TTGATAATGA	TTATATATCA											2645
AATATCTTTT	CTCGATTGCGT	CGTGACACAC	GTCACATGAG	TCCATGGTGC	ACGCCTTCGC											2705
TCGACCCACG	ACCAGACAAT	TTTAGCTGAC	GTCCCGTTA	GACTCATTAG	AATTGAATT											2765
CATTCTAATA	ATAGTAATT	AGGCATATAT	TAACTAAGAT	AATTGATTT	TATACAAAAT											2825
ATATTGGTAT	ATTATTATTA	GTAAGATGTC	GAAGATATT	ATGTGCTACA	TTTTTACTAT											2885
AGAGGAGTGA	GACGAAAAGT	GTCATGTAAG	TTATATAGAA	GAAACAAATT	CTACTCATGC											2945
ATAAAAATCAT	TTCTCATCCC	CCACCCCATG	AATTTGAGAT	AAGCTT												2991

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: US

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

AACAGCTATG ACCATG

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: U3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GTAAAACGAA CGGCCAGT

18

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 105 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: o1 MUP1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CATGAACTTC CTCAAAAGTT TCCCCTTTA TGCCTTCCTT TGTTTGGCC AATACTTGT

60

AGCTGTTACT CATGCTGACT CGGAAGGAGT AGCAGCAAAG GTGGC

105

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: o1 MUP2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GATCAAACAC TAAGCTCAAT AAGGATGG

28

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 34 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: o1 MUP9

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGAAGTTCAT GGATCAAACA CTAAGCTCAA TAAG

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: o1 MUP10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TTAAGAGTTT CCCCTTTAT GCCTTCCTTT

36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 14 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: peptide mineur

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Xaa Xaa Glu Asp Gly Glu Ser Lys Ala Gly Met Thr Asp Leu  
1 5 10

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: peptide majeur

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Ala Gly Met Thr Asp Leu Leu Met Leu Thr Asp Lys Ser Gln Leu  
1 5 10 15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: oligo A

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

ATGGACTCGG AAGGAGTAGC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: oligo B

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

ATGGACTCGG AAGGAGTTGT

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: oligo C

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GCTGTAGCAG TCGCTCACCG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: oligo D

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CTGGGAGTAG GCGCGGGAGT G

21

REFERENCES

- Armstrong C. L. (1994) Regeneration of plants from somatic cell cultures : applications for in vitro genetic manipulation. Freeling M., Walbot V. Eds ; 665-671.
- 10 - Basso B., Bagnaresi P., Bracale M., Soave C. (1994) The Yellow-stripe-1 and -3 mutants of maize : nutritional and biochemical studies Maydica 39 : 97-105.
- Barrier-Guillot B, Pala-Teles J.C., Métayer J.P., Maupetit P., Gene F., 1994, Journée Valicentre, Chambray les Tours, décembre 93-104.
- 15 - Bevan M., Flavell R., and Chilton M.-D. (1983) A chimeric antibiotic resistance marker for plant transformation. Nature 304 : 184-187.
- Bevan M., Barnes W. M., and Chilton M.-D. (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucleic AcSEQ ID Research 11 : 369-385.
- Bitar K. Reinhold J.G., 1972. Bioch Biophys Acta., 66557, 442-452.
- 20 - Cao J., Duan X., McElroy D., and Wu R. (1992) Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. Plant Cell Reports ; 11 : 586-591.
- Chenchik A., Moqadam F., and Siebert P. (January 1995) Marathon cDNA amplification : A new method for cloning full-length cDNA. CLONTECHniques IX (1) : 9-12 .
- 25 - Cornelissen B. J. C., Hooft van Huijsduijnen R. A. M., and Bol J. F. (1986) A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. Nature 321 : 531-532.
- Dellaporta S.L., Wood J. et Hicks J.B. (1983) Plant Mol. Biol. Repr. 1, 19 - 22.
- 30 - Ehrlich K.C. et Montalbano B.G. (1992) Plant Physiol., supplément 99, abrégé 515
- Ehrlich K. C., Montalbano B. G., Mullaney E. J., Dischinger H. C. Jr, et Ullah A. H. J. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 195, 53 - 57.
- Finner J. J., Vain P., Jones M. W., and McMullen M. D. (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. Plant Cell Reports, 11 : 323-328.
- 35 - Frischau, A.-M., H. Lehrach, A. Poustka, and N. Murray. (1983). Lambda replacement vectors carryings polylinker sequences. J. Mol. Biol. 170 : 827.

5 - Gellatly K. S., et Lefebvre D. D. (1990) *Plant Physiol.*, supplément 93, abrégé 562.

- Gibson D. M. et Ullah A. B. J. (1990) dans *Inositol Metabolism in Plants*, pp. 77 - 92, Wiley - Liss, New-York.

10 - Guille H., Dudley R.K., Jonard G., Balazs E., and Richards K.E. (1982) Transcription of cauliflower mosaic virus DNA : detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell* 30 : 763-773.

- Graf E. dir. pub. (1986) *Phytic acid, chemistry and applications*, Pillsbury Co., Pilatus Press ; Minneapolis, M. N., USA.

15 - Hiei Y., Ohfa S., Komari T. and Kumashiro T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oriza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6 : 271-282.

- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., and Kumashiro T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14 : 745-750.

- Jefferson R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants : the GUS fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5 : 387-405.

20 - Joshi C. P. (1987) *Nucl. Acid. Res.* 15, 9627 - 9641.

- Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., and Sanford J. C. (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acid SEQ ID into living cells. *Nature* ; 327 : 70-73.

25 - Labouré A. M., Gagnon J. et Lescure A. M. (1993) *Biochem. J.*, 295, 413- 419.

- Lander E. S., Green P., Abrahamson et al. (1987) MAPMAKER : an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181.

- Logemann J., Schell J. et Willmitzer (1987) *Anal. Biochem.* 163, 16 - 20.

30 - Mac Elroy D., Blowers A. D., Jenes B., Wu R. (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* 231 : 150-160.

- Maniatis T., Fritsch E. F. et Sambrook J. (1982) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 1ère édition (Cold Spring Harbor, NY ; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

35 - Marin E., Nussaume L., Quesada A., Sotta B., Gonneau M. et Marion-Poll A. (1996) *EMBO J.*, 15, 2331-2342.

5 - Murigneux A., Baud S., and Beckert M. (1993b) Molecular and morphological evaluation of doubled lines in maize. 2. Comparison with single seed descent lines. Theor. Appl. Genet. 87 : 278-287.

10 - Nair V. C. et Duvnjak Z. (1990) Appl. Microbial Biotechnol. 34, 183 - 188.

15 - O'Dell B. L., de Bolant A. R. et Koirtyohann S. M. (1972), J. Agr. Food. Chem., 20, 718 - 721.

- -Ostanin K., Harms E. H., Stevis P. E., Kuciel R., Zhou M. M. et van Etten R. L. (1992) J. Biol. Chem. 267, 22830 - 22836.

- Pen J. (1991) The expression of phytase in plant, EP-0 449 375.

- Pen J., Verwoerd T. C., van Paridon P. A., Beudeker R. F., van den Elzen P. J. M., Geerse K., van Ooyen A. J. J. et Hoekema A. (1993) Bio/Technology 11, 811 - 814.

20 - Piddington C. S., Houston C. S., Paloheimo M., Cantrell M., Miettinen-Oinonen A., Nevalainen H. et Rambosek J. (1993) Gene 133, 55 - 62.

- Pointillard A. (1994) INRA-Productions Animales 7, 29 - 39.

25 - Raboy V., Pickett S., Galli T., Ertl D., Cook A. and Young K. (1995) Low phytic acid loci : two or many ? 37TH annual Maize genetics conference, Asilomar: Abstract p. 6.

- Reina M., Ponte I., Guillen P., Borona A. and Palau J. (1990) Sequence analysis of a genomic clone encoding a Zc2 protein from *Zea mays* W64 A. Nucleic AcSEQ ID Research 18 : 6425-6426.

- Robert L. S., Thompson R. D., Flavell R. B. (1989) Tissue-specific expression of Wheat High Molecular Weight Glutenin gene in transgenic tobacco. The Plant Cell 1 : 569-578.

30 - Sanger F., Nicklen S. et Coulson A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463.

- Sauveur B., 1983, Proc. 4<sup>th</sup> Europ. Symp. Poult. Nutr., Tours. 17-20 octobre. 103- 113.

- Sijmons P. C., Dekker B. M. M., Schrammeijer B., Verwoert T. C., van den Elzen P. J. M., and Hoekema A. (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. Bio/Technology 8 : 217-221.

35 - Simons P. C. M., Wersteegh H. A. J., Jongbloed A. W., Kemme P. A., Verschoor G. J. (1990) Br. J. Nutr. 64, 525 - 540.

- Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517

5        - Vain P., Yean H., Flament P. (1989) Enhancement of production and regeneration  
of embryogenetic type II callus in *Zea mays L.* by silver nitrate. *Plant Cell Tissue  
and Organ Culture*. 18 : 143-151.

10      - van Hartingsveldt W., van Zeijl C. M. J., Hartevelde G. M., Gouka R. J.,  
Suyberbuyk M.E.G., Luiten R. G. M., van Paridon P. A., Selton G. C. M.,  
Veenstra E. E., van Gorcom R. F. M. et van den Hondel C. A. M. J. J. (1993)  
Gene 127, 87 - 94.

15      - Van Steveninck *et al*, 1993, *Plant and Soil* 155/156. 525-528

      - Verwoerd T. C., van Paridon P. A., van Ooyen A. J. J., van Lent J. W. M.,  
Hoekema A. et Pen J. (1995) *Plant Physiol.* 109, 1199 - 1205.

5

REVENDICATIONS

1. Séquence d'ADN identique ou homologue à plus de 70 % de tout ou partie de la séquence telle que définie dans SEQ ID N° 1.
- 10 2. Séquence d'ADN identique ou homologue à plus de 70 % de tout ou partie de la séquence telle que définie dans SEQ ID N° 2.
3. Séquence d'ADN identique ou homologue à plus de 70 % de tout ou partie de la séquence telle que définie dans SEQ ID N° 3.
- 15 4. Séquence d'ADN caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie d'une séquence complémentaire ou complémentaire de l'homologue d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 3.
- 20 5. Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 3 comme sonde moléculaire.
6. Fragment d'acide nucléique codant pour une phytase de plante.
- 25 7. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il code pour une phytase de céréale
8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 6 ou 8, caractérisé en ce qu'il code pour une phytase de maïs.
- 30 9. Fragment selon la revendication 6, 7 ou 8 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'ADNc.
10. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 6 à 9 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence de nucléotides substantiellement telle que montrée dans l'identificateur de séquences (SEQ ID) n° 1 codant pour une activité phytase.
- 35 11. Fragment selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence codante allant du nucléotide n° 32 à 1192 de SEQ ID n° 1.

5

12. Fragment selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence complète de 1335 nucléotides telle que montrée sur SEQ ID n° 1.

10

13. Fragment selon la revendication 6, 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'ADN génomique.

15

14. Fragment selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence telle que définie dans SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 3.

15

15. Fragment caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence complémentaire, homologue ou complémentaire de l'homologue d'une séquence telle que selon l'une des revendications 10 à 14.

20

16. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend de l'ADN génomique de la plante.

25

17. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est constitué par de l'ADNc et comporte en outre une partie des fragments introniques de l'ADN génomique.

30

18. Promoteur d'un gène de phytase de plante

19. Promoteur d'un gène de phytase de céréale.

20. Promoteur d'un gène de phytase de maïs.

35

21. Promoteur d'un gène de phytase de plante selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il contient tout ou partie du fragment allant du nucléotide n° 1 au nucléotide n° 2096 de la séquence telle que définie dans SEQ ID N° 2.

40

22. Promoteur d'un gène de phytase de plante selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il contient tout ou partie du fragment allant du nucléotide n° 1 au nucléotide n° 1328 de la séquence telle que définie dans SEQ ID N° 3.

5 23. Promoteur d'un gène de phytase de plante caractérisé en ce qu'il comprend une séquence identique ou homologue à plus de 70 % de la séquence du promoteur tel que défini dans la revendication 19 ou 20.

10 24. Promoteur d'un gène de phytase de plante caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence complémentaire ou complémentaire de l'homologue d'une séquence telle que définie dans la revendication 23.

15 25. Utilisation d'un promoteur selon l'une des revendications 18 à 24 dans des constructions moléculaires destinées à améliorer la qualité agronomique alimentaire ou industrielle d'une plante, notamment la résistance aux pathogènes ou la disponibilité en nutriments.

20 26. Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comporte un fragment d'ADN selon l'une des revendications 6 à 17, placé sous le contrôle de séquences régulatrices capables de commander l'expression de ladite phytase.

25 27. Cassette d'expression, caractérisée en ce qu'elle comporte un promoteur tel que défini dans l'une des revendications 18 à 24.

30 28. Cassette d'expression selon la revendication 26, caractérisée en ce que lesdites séquences régulatrices sont capables de commander l'expression spécifiquement dans un type particulier de tissu.

35 29. Procédé pour accroître la teneur en phytase d'une plante, caractérisé en ce qu'on transforme ladite plante avec un vecteur comportant une cassette d'expression selon l'une des revendications 26 à 28 dans laquelle lesdites séquences régulatrices sont capables de commander l'expression de ladite phytase dans ladite plante.

30 30. Hôte végétal consistant en une plante ou organe végétale, notamment transgénique, contenant une quantité accrue de phytase, caractérisé en ce que l'hôte végétal a été transformé avec une cassette d'expression selon l'une des revendications 26 à 28.

40 31. Plante transgénique selon la revendication 30, caractérisée en ce qu'elle produit des semences transgéniques exprimant une quantité accrue de phytases.

5

32. Hôte végétal consistant en une plante ou organe végétal transgénique dans lequel la phytase de plante est exprimée dans une partie de la plante ou un compartiment cellulaire où cette enzyme n'est pas produite naturellement, caractérisé en ce qu'on a introduit une cassette d'expression selon la revendication 26 comportant des séquences régulatrices qui induisent une expression spécifique dans ladite partie de la plante ou ledit compartiment cellulaire.

10

33. Plante ou organe végétal selon l'une des revendications 30 à 32, caractérisée en ce qu'il s'agit de céréales.

15

34. Plante ou organe végétal selon la revendication 33, caractérisée en ce qu'il s'agit de maïs.

20

35. Semences sèches de plante selon l'une des revendications 30 à 34.

25

36. Semences selon la revendication 35, caractérisées en ce qu'elles comportent une teneur globalement ou localement accrue en phytase obtenue par une expression spécifique dans la semence de la séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 4 ou du fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 6 à 17.

37. Farine de semences obtenue à partir d'une semence selon l'une des revendications 35 et 36.

30

38. Méthode de production de phytase, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

35

a) transformation d'un hôte eucaryote ou procaryote, en particulier d'un végétal ou d'un microorganisme avec une cassette d'expression selon la revendication 26, comportant des séquences régulatrices capables de commander l'expression d'une quantité accrue de phytase dans l'hôte végétal ou le microorganisme respectivement ;

b) culture du microorganisme transformé ou croissance de la plante transformée ; et

40

c) extraction de la phytase de la culture de microorganismes ou des tissus végétaux transgéniques.

5

39. Phytase recombinante obtenue par le procédé de la revendication 38.

40. Phytase selon la revendication 39, caractérisée en ce qu'elle est un dimère ou un hétérodimère.

10 41. Anticorps dirigés contre la phytase de la plante selon la revendication 39.

42. Composition pour l'alimentation humaine ou animale comprenant tout ou partie de plante selon l'une des revendications 30 à 36 ou une farine de semence 15 selon la revendication 37.

43. Composition pour l'alimentation humaine ou animale comprenant une phytase de plante selon la revendication 39.

20 44. Composition pour l'alimentation humaine ou animale selon la revendication 42 ou 43, caractérisée en ce que la plante est choisie parmi le blé, l'orge, le sorgho, le maïs, le pois, le soja et la pomme de terre.

25 45. Utilisation d'un fragment selon l'une des revendications 6 à 17 comme marqueur d'un phénotype lié à l'expression de la phytase.

46. Utilisation d'une phytase selon la revendication 39, pour l'extraction d'amidon à partir de grains de plantes et/ou pour la valorisation des eaux de trempage ou de brassage.

30 47. Utilisation de tout ou partie de plante selon l'une des revendications 30 à 36, pour l'extraction d'amidon à partir de grains de plantes et/ou pour la valorisation des eaux de trempage ou de brassage.

FIGURE 1

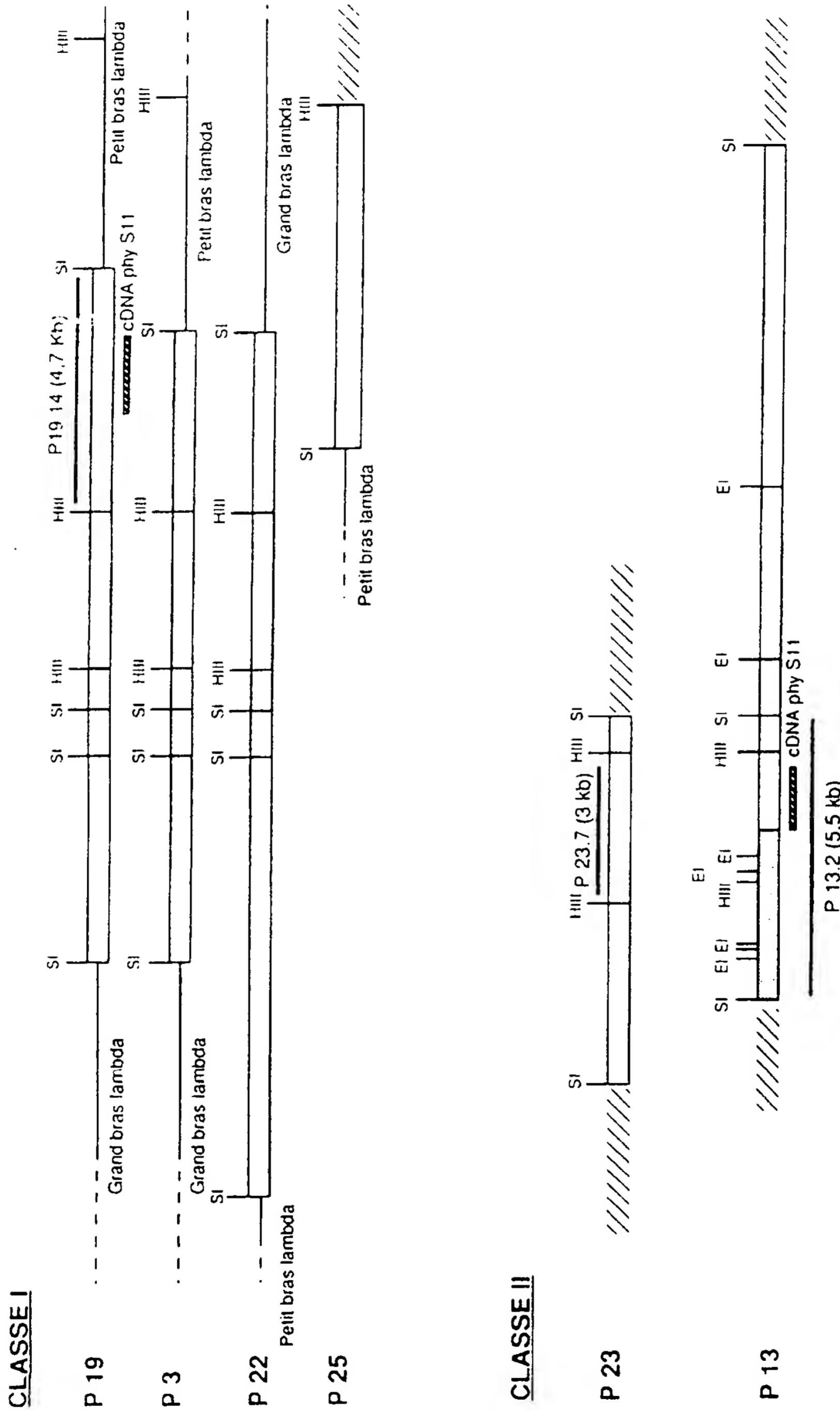
616 CAGC'CCCC'ACGGCAACGGACCTGGAGCTGGTACAAACAGCC 696  
 206 Q L R L G Y G S K G S E F E D L D T D K L E V Y N S 232  
 -  
 697 A'CA'CC'CC'CGACTCGGGCTACCGGATGCTCTCATCGGGCTAACATGGCA 777  
 233 I I V E S G R A G L P V R M F S S G R S A C G P K I A 259  
 -  
 778 GCCAACCGTGGCGTGGCGTGGCGTGGCGTGGCGTGGCGTGGCGAC 858  
 260 A T T W A Q A V S V F I M A A G N L A W D V F T T E H 286  
 -  
 859 CAGG'GGAGCCCA'CC'CAAGGGCAGGCTAACCTCCTGGAGGGCTAGGG 939  
 287 E V F A I L K G S L N L A G L G G F A V E A V V G A 313  
 -  
 940 GCTG'CAACGGCGTCC'ACGGCTGGCTCTGGCTGGCGCATCGGCC 1020  
 314 A V T K A V A N V A A G V F A C S L A G F V V G A I 340  
 -  
 1021 GGGC'CTGAT'CC'ACCCGGTCAAGGGCGTCC'CATTAACCTCATCGGCAG 110  
 341 G L I F V G V S G L L I N L I G S P R K V P D M S K 367  
 -  
 1102 C'CTGAT'CC'ACCCGGTCAAGGGCGTCC'CATCGGCAG 118  
 368 L H F H T A V M P D G M A L A V S H \* 38  
 -  
 1183 G'TCACTTACCAAACTGGCTGGAAATAATTGATAATTGAT'ATG 126  
 1264 'TAAATACAAATAAATGAT'ATGAT'ATGAT'ATGAT'ATG 130

FIGURE 1 (suite)

Zea mays phy	I	D	F	A	E	L	V	R	H	Q	L	R	G	Y	G	S	K	G	E	F	E	D	L	D	D	T	Q	K	L	E				
Asp. phyA	V	T	F	A	Q	V	L	S	R	H	G	A	R	Y	P	T	E	S	K	G	K	E	A	L	I	E	Q	N	Q	N				
Asp. phyB	V	D	Q	V	I	M	V	K	R	H	G	E	R	Y	P	S	P	S	A	G	K	S	I	E	E	A	L	A	K	V	Y	S	I	N

FIGURE 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

FIGURE 3

aagctttctg aaaaagtcca atcactaaaa ttgagttcag agtaaaaact tatggcattt ttcgtgaagc tggttgtgca  
160  
gcggcaatgc gacacggatg agcggcagca tagggcctgt atagccccaa acagcttgtt ttaaccccaa cgactagtt  
240  
tggttgggt tatatttaca catcccacgc cctggggtcc tgctggtgtc tagaatagtt ccaaactcattt ccaaaccata  
320  
tttaagccct ctctaattcc tctatttatg ggagcgtgtg actagtgtt gattacggtt aaagaactga ttaagagcta  
400  
gagagcagat cttagagcaag acaaccttga gcacttgcac ggcttcgtca acattcattt cacactcattt actcttggag  
480  
gggaaggcctc ctcaacggctt aggcgtcccc cgggtatctc ccattgttgc ttgtgaaccgc aggaaagtctt gtaattaccc  
560  
catacttag taaaaaaacc agctcagtat ttgggtggtg agttgaaaca gactcctttt agcttcctca acaacatgga  
640  
cttagacata gcctgacaca ctcttattttt ggatatctt actcctttaa agcaccagtt tcttgcgtcg ttgtgtcacgt  
720  
gcgaaaacttg ttatgtgtt gctctccctt gcatcttgcc tgaccatgga cccaataggt ttgtataccca tagataggcc  
800  
atgatagact acccaacgag ctcaacccga taggaagcca cacacaacgc aacactctca catagttacca cctcgcttagc  
880  
ggaagggaac gagcgatcga gcgagctata aaaaatgttca gtcgttgtt catgcctggc gtggccataaa ttatttttag  
960  
ggtagtttag attacttttag tctcggtattt aaagtttagt cattactctg ttgggttca gagattaaaa atgttccataaa  
1040  
ctcactaaaa aatttgttag aagacccaaa tatttttat cattctctcg ccattactctt tctcccgccga caacggaaat  
1120  
aaataagggg caaccatgaa attgacatgt tttaggggtt gtttgaatgc acttagagcta atgtttagtc agctaaaaat

FIGURE 4

1200

atactagtag aattagctaa ctaacaaata gtagctaac gagtagctaa ttactaaaa atagttataa gctaaactat  
1280  
atattagcta taggtgttt ggtatgtctct agctaattt agctaactat tatctctagt gcattcaaata aaccctttaa  
1360  
tcccattttag tcactcgagg aactactatt tccgggtctt tattattat cgttttggat aaggtttgag taaaacttat  
1440  
aaattttta ctataaataa ctatttgat attagttga aaacctaata ctatatgca taggtttgtc taaaaaagta  
1520  
cttttataaa agtataaaatg taataagagt ttatttgtat tttaggaaaa aacatcggtc aaagctataat atatttgga  
1600  
gactatatcg ttgtcctaaa cgacaataaa aaggcacccga gagagtaggg actaaagcgg tttaatctat cctttactgt  
1680  
tatttttga taatttatgg attaatgaga ctaaaattct atgactaatac tttagtcccc aaactaaaca aacccttagt  
1760  
atgattgtatc ctggacagca tacagacccca tgcttaactt gatacaacac caacaagacc agacccacc cccttccctt  
1840  
tcaacggagg gatgatataat tatttaagtg catgcgcgtg ctgcacgctg ttatggacct attttgttagg actaggagta  
1920  
ggatataatc cacaaagttg tataacctata aatagctcgc tttagtataa ttagtgcgtg ccttatacga aacatagctt  
2000  
ctcctactac tcaaATCCAT CCTTATTgtt agtgcggctt tataagctac tactagttac aagctggttt atacttaact  
2080  
acaagtagca acgatttgcc ttatgtatata tggttcataa tacataaata tggaaactga gacaatataat atatgcagGA  
2147  
GCTTACGTCTT TGATCC ATG GAC TCG GAA GGA GTA CCA GCA AAG GTC CCA CAT GAG ACT ACT AAA CCC  
Met Asp Ser Glu Gly Val Ala Ala Lys Val Ala Asp Glu Thr Thr Lys Pro

FIGURE 4 (suite)

+

GCA AGC CAA GAA GAC GGC GAG AGC AAG GCC GGG ATG ACT GAT CTG CTG ATG CTG ACC GAC AAG TCG  
Ala Ser Gln Glu Asp Gly Glu Ser Lys Ala Gly Met Thr Asp Leu Leu Met Leu Thr Asp Lys Ser

+

CAG CTG CAG GCG CTA GCG ATG CTG CTG CCG AAC AAC GAG GAG CTC ATG ATG AGC CAA GCG ATC AAG  
Gln Leu Gln Ala Leu Ala Met Leu Leu Arg Asn Asn Glu Glu Leu Met Met Ser Gln Ala Ile Lys

+

TCG GAG ACG GAG CGC GTT GAG TAC CTC AAG ACG GTG AGC GAC TCC TAC ACG CGG ACA ATG AAG CTC  
Ser Glu Thr Glu Arg Val Glu Tyr Leu Lys Thr Val Ser Asp Cys Tyr Thr Arg Thr Met Lys Leu

+

CTT GAC GAC TCC ATG GCG GCC AGG ATC ACG TAC GAG CGT TCG GGC GGA ACG AGG AGC CTC GTC GCC  
Leu Asp Asp Ser Met Ala Ala Arg Ile Thr Tyr Glu Arg Ser Gly Gly Thr Arg Ser Leu Val Ala

+

CGG GAC ATG GAC GAC TAC GTC TAC GGC CTC AAC GCG TCC TTG CAG AAC GTC CGC AAC TGC TGC  
Arg Asp Met Asp Asp Tyr Val Val Tyr Gly Leu Asn Ala Cys Leu Gln Asn Val Ara Asn Cys Cys

+

GTG CGT CTG GAC GCC ATC GAC AAG CTG CGG GCG CAC TAC GAC GCC CTC CCC GAC GCC GTC GCC GAA  
Val Arg Leu Asp Ala Ile Asp Lys Leu Arg Ala His Tyr Asp Ala Leu Ala Asp Ala Val Ala Glu

+

CCG GCC AAC GTC GAG CGC CTC CGC GCG GAG GCG TCC GAG TAC AAG GCC GCC ATG TCG CAG TAC  
Pro Ala Ala Asn Val Glu Gly Leu Ala Glu Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Ala Met Trp Gln Tyr

+

TGC TAC AAC CAG CGG AGC GCC TCC CGG CGG CAC TCC CCC TAC TCC CAG CGG CTC AAG CTG  
Cys Tyr Asn Gln Arg Ser Ala Ser Ala Arg Ala His Ser Arg Ala Tyr Ser Gln Ala Leu Lys Leu

+

GAG GGC ATC GAC TTC GCC GAG CTT GTG CGG AGG CAC CAG CTC CGG CTC CGG TAC GGC AGC AAG GGC  
Glu Gly Ile Asp Phe Ala Glu Leu Val Arg Arg His Gln Leu Arg Leu Gly Tyr Gly Ser Lys Gly

+

GAG GAG TTC GAG GAC CTG GAC GAC ACC CAG AAG CTG GAG GTG TAC AAC AGC ATC ATC GTC GAG TCG  
Glu Glu Phe Glu Asp Leu Asp Thr Gln Lys Leu Glu Val Tyr Asn Ser Ile Ile Val Glu Ser

+

GGG CGG CGG CGG CTA CCG GTG CGG ATG TTC TCG TCG CGC CGC TCT GGC CGT CGC CCT AAG ATT GCA  
Gly Arg Ala Gly Leu Pro Val Arg Met Phe Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Pro Lys Ile Ala

+

CCC ACG ACG TGG GCG CAG GCG GTG AGC GTC TTC ATC ATG GCG CGC AAC CTG CGG TCG GAC GTG  
Ala Thr Thr Trp Ala Gln Ala Val Ser Val Phe Ile Met Ala Ala Gly Asn Leu Ala Trp Asp Val

FIGURE 4 (suite)

3005

TTC ACC ACG GAG CAC GAG GTG GAG GCC ATC CTC AAG GGC AGC CTC AAC CTC CTG GCG GGG CTA GGG  
Phe Thr Thr Glu His Glu Val Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu Asn Leu Ala Gly Leu Gly

3071

GGC TTC GCC GTG GAG GCC CTC GTC CCC CCT GTC ACC AAG CCC GTC GCA AAC CTC CCC CCC GGC  
Gly Phe Ala Val Glu Ala Val Val Gly Ala Ala Val Thr Lys Ala Val Ala Asn Val Gly Ala Gly

3137

GTC TTT GCT TGC TCT CTC GCG GCC TTC GTC GTG GGC GCC ATA CCC GGG CTG ATC TTC ATC GGC GTC  
Val Phe Ala Cys Ser Leu Ala Gly Phe Val Val Gly Ala Ile Ala Gly Leu Ile Phe Ile Gly Val

3203

AGC GGC CTC CTC ATT AAC CTC ATC ATC GCC TCC CCT AGG AAG GTG CCT GAC ATG AGC AAG CTC ATG  
Ser Gly Leu Leu Ile Asn Leu Ile Ile Gly Ser Pro Arg Lys Val Pro Asp Met Ser Lys Leu Met

3270

TTC CAC ACC CCC GTC ATG CCC GAT GGA ATG GCC CTT GCG TAT GCG GTC TCT CAT TAA TTACTTATTA  
Phe His Thr Ala Val Met Pro Asp Gly Met Ala Leu Ala Tyr Ala Val Ser His

3350

TCATCGCAGT GACTACCGAT GCAACTGCTT CAGATCCTAC TGTGGAACG CGTGTGAAA TAATAAAGGA ATAATAATAA

3430

TTATTATTGT AATAACAATA ATTATCATAT ATTGATAATG ATTATATATC AAAtagcttc tctcgattcg tcgtgacaca

3510

cgtcacatga gtccatggtg tgccccgtt cgcacgaccc acgaccggac agacaattt agctgagtgt taaattttg

3590

tctcgagtac aaatccacgg ggcaaagaaa ggccatcgag caaatcgaac atttaatttg tgcagacac tcggtaaaga

3670

aatcaaattt ttgggtgtcaa cacttaacaa agaaaaacaa tcagtaaaaaa ggttgtttaa ctaatatcggt atacttatca

3750

aataaaaatg ctgcacaaaa agtggtttgg ctatgtcac catcgacac taataccacc taaccaccat tcttttgcc

3830

gagtgtccaa ccgcgtcact cgtcaaagga ggccttttg ttggtagcca ttcttagact ctatgttaat aggtatttgc

3910

ctagcgtcag ctcaaaatag gaggcaaaga tgcactttgt gtattattat ctcttttac acccaacaaa gtatttttta

FIGURE 4 (suite)

3990

ttttttctt cttgccctaa aacttgtct gctatattcc tataacaccc agaactacat gttcagttt ggtacatttc

4070

tcagtgtttt gtagatttag taaatttatt ttatatact gaatttcttg agataattca aatttgaacg gtaagtcatt

4150

cgtataatga aaacatgaat agaaaacaga tggcatgtt actaagtata agtgaggc gttacaata atagaccaga

4230

aaattcgaac attatgttca cgaaatatca ccatgtacaa ttgttttaa attgtataaa aagcaaacga agtttggaaa

4310

attataaaaac ttccggatg tcatgatatc ataagtggag gctataataa aaggttgata aagtttcatt aaagtttgac

4390

atgtactatg gttaccacct aatcaatctc catatgaaac aaatcatgaa acatattcgt cgattttcg gtttgtaaac

4470

attcatgaaa tcatgtcaac ttttatcac agcctccaca tataaactat catgattttc taactttgtt tgcttttat

4550

ataatttaaa aacggttttt tggacactag gcaaagagct tcttgccaa gtgtttttg gactttggc aaagacaata

4630

gttggaaact ttttgatttt aagacatctt gtcaatgaaa actatgtctg aatttttta aaaaatgtat tcaaaatttt

4695

caaatgaccc cgaatgaaaa aatcaccaaa ataatagttt tagatccgtt gacccgcagg tcgac

FIGURE 4 (suite)

80

aagcttaaag atcccattgg aagttaaact ctcggaaaga gttgatcgga tggtagacta acttctgacg gtcgttgggg  
160  
\*  
cccatcgaa gtttagcgacg taaacgttgt tagcaccgaa acttcttaacc attttagtgg cctctcgaa gtttttgtgc  
240  
\*  
taacttccaa ggggtcccac cggcttctca aaagttaatg tgctaacttc aggccatttt agtggctct cgaaatttat  
320  
\*  
attgaaccaa cattcaaaat gtttttatt tcccaatttc actatatttc aatacatcg gataccaacc atccggaaaa  
400  
\*  
caacactaac tgcaatagca tctcatctgt ttcatcaca taacaccaca cctcataaaat ctcataatt aaacacaatt  
480  
\*  
ccaatatatt ttttcaaaat aagaactcaa tttagtctcat ctcaacccaa gacacatccc aaatgtctt cagggttcac  
560  
\*  
aagttcacct cccatctatt tgaactatac ttatataatt aacaaacaac attagttaa atatcataca ttttagttatg  
640  
\*  
tcttttcct cattttact cgtagccatg atttttgtt agttttgcct ttctgtct tcagcaacag aataacaaaa  
720  
\*  
ctgagtagaa aatacaacta agggtaaaaa taaggaaagc ggtagaacta acggcaccac ttcaaaatgt cgtatttaa  
800  
\*  
ataattttagt gttcatcaaa tactaaaatt caaaattaaa gacctctaga gtatattttt ttacaagct ccagtgggtgg  
880  
\*  
ccgtgcctcg cgtggccata atcatccta gtatgattga tcatggacag ggtacagacc catgttgac ttgataaaaac  
960  
\*  
accaacaata ccagacccca tcccccccc tatcaacaac ggagggacga tgatataat ttaggtct gttcgatcac  
1040  
\*  
tctactatta tattcactct aaatcatatg tgtaataact agagtaccta aacaaggct taagtgcatt cacgtgtgc

FIGURE 5

11/14

1120

acgctgttat ggacctatta ggttagtaga ggtcgagtag gatataatac acaaagggt atacctataa atagctcgct

1200

ttgataacat gatctgctgc cttatacgaa acatagctac CTACTACTCA AGTATCCATC CTTATTGaa gtgctttat

1280

aagctactac tagttacaag ctggttata tttaactaca agtagcaacg atttgcctta gtatataatgg ttcataatac

1355

atatatattg gaactgagat aatatatgca gGAGTACAGT GTTGATCC ATG GAC TCG GAA GGA GTT GTA GCA GCA  
Met Asp Ser Glu Gly Val Val Ala Ala

1421

AAG GTG GCA GAT GAG ACT ACT AAA CCG CCA ATC CAA GAA GAC GCC GCG GAG AGC AAG CCC GGG ATG  
Lys Val Ala Asp Glu Thr Thr Lys Pro Ala Ile Gln Glu Asp Gly Ala Glu Ser Lys Ala Gly Met

1487

ACT GAT CTG CTG ATG CTG ACC GAC AAG TCG CAG CTG CAG GCG CTG CCG ATG CTG CTG CCG AAC AAC  
Thr Asp Leu Leu Met Leu Thr Asp Lys Ser Gln Leu Gln Ala Leu Ala Met Leu Leu Arg Asn Asn

1553

GAG GAG CTC ATG ATG AGC CAG GCG ATC AAG TCG GAG ACG GAG CGC ATT GAC TAC CTC AAG ACC GTC  
Glu Glu Leu Met Met Ser Gln Ala Ile Lys Ser Glu Thr Glu Arg Ile Glu Tyr Leu Lys Thr Val

1619

AGC GAC TGC TAC ACG CCG ACG ATG AAG CTC CTC GAC GAT TCC ATG GCG GCC AGG ACC ACC TAC GAG  
Ser Asp Cys Tyr Thr Arg Thr Met Lys Leu Leu Asp Asp Ser Met Ala Ala Arg Thr Thr Tyr Glu

1685

CGT TCG GGC GGA ACG AGG AGC CTC GTC GCC CCG GAC ATG GAC GAC TAC GTC GTC TAC GGC CTC AAC  
Arg Ser Gly Gly Thr Arg Ser Leu Val Ala Arg Asp Met Asp Asp Tyr Val Val Tyr Gly Leu Asn

1751

CCG TGC TTG CAG AAC GTC CGC AAC TGC TGC GTC CGC CTG GAC GAC CCC ATC GAC AAG CTC CGG GCG CAC  
Ala Cys Leu Gln Asn Val Arg Asn Cys Cys Val Arg Leu Asp Ala Ile Asp Lys Leu Arg Ala His

1818

AAC GAC GCC CTC GCC GAC CCC CTC CCC GAC CCC CCC AAC GTC GAG GCG CTC GCG CCC GAG CCC  
Tyr Asp Ala Leu Ala Asp Ala Val Ala Asp Pro Ala Ala Asn Val Glu Gly Leu Ala Ala Glu Ala

FIGURE 5 (suite)

1883

TCC GAG TAC AAG GCC GCC ATG TGG CAG TAC TGC TAC AAC CAG CCG AGC GCC TCC GCG CCG CCG CAC  
Ser Glu Tyr Lys Ala Ala Met Trp Gln Tyr Cys Tyr Asn Gln Arg Ser Ala Ser Ala Arg Ala His

1949

TCC CGC CCC TAC TCC CAG GCG CTC AAG CTG GAG GGC ATC GAC TTC GCC GAG CTG CTG CGG AGG CAC  
Ser Arg Ala Tyr Ser Gln Ala Leu Lys Leu Glu Gly Ile Asp Phe Ala Glu Leu Val Arg Arg His

2015

CAG CTC CGG CTC GGG TAC GGC AGC AAG GGC GAG GAG TTC GAG GAC CTG GAC GAC ACC CAG AAG CTG  
Gln Leu Arg Leu Gly Tyr Gly Ser Lys Gly Glu Phe Glu Asp Leu Asp Asp Thr Gln Lys Leu

2081

CAG GTG TAC AAC AGC ATC ATC GTC GAG TCG GGG CGG GCG GGG CTA CCG GTG CGG ATG TTC TCG TCG  
Glu Val Tyr Asn Ser Ile Ile Val Glu Ser Gly Arg Ala Gly Leu Pro Val Arg Met Phe Ser Ser

2147

GCC CGC TCT GCC GGT GGC CCT AAG ATT GCA GCC ACG ACG TGG GCG GAG GCG GTG AGC GTC TTC ATC  
Gly Arg Ser Ala Gly Pro Lys Ile Ala Ala Thr Thr Trp Ala Glu Ala Val Ser Val Phe Ile

2213

ATG GCG GCG GGC AAC CTG GCG TGG GAC GTG TTC ACC ACG GAG CAC GAG GTG GAG GCC ATC CTC AAG  
Met Ala Ala Gly Asn Leu Ala Trp Asp Val Phe Thr Thr Glu His Glu Val Glu Ala Ile Leu Lys

2279

GGC AGC CTC AAC CTC CTG GCG GGG CTA GGG GGC TTC GCC GTG GAG GCC GTC GTC GGC GCG GCT GTC  
Gly Ser Leu Asn Leu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Val Glu Ala Val Val Gly Ala Ala Val

2345

ACC AAG CCC GTC GCA AAC GTC CCC GGC GTC TTT CCT TCC TCT CTC CCC TCC TTC GTC GTC GTC GGC  
Thr Lys Ala Val Aal Asn Val Gly Ala Gly Val Phe Ala Cys Ser Leu Ala Gly Phe Val Val Gly

2411

GCC ATC GCC GGG CTG ATC TTC GTC GGC GTC AGC GGC CTC CTC ATT AAC CTC ATC AIC UGC TCC CCA  
Ala Ile Ala Gly Leu Ile Phe Val Gly Val Ser Gly Leu Leu Ile Asn Leu Ile Gly Ser Pro

2477

AGG AAG GTG CCT GAC ATG AGC AAG CTC ATG TTC CAC ACC GGC GTC ATG CCC GAT GGA ATG GGC CTT  
Arg Lys Val Pro Asp Met Ser Lys Leu Met Phe His Thr Ala Val Met Pro Asp Gly Met Ala Leu

2550

GCG TAT GCG GTA TCT CAT TAATT ACTTAATATC ATCGCAGTGA CTACCAATGC AACTGCTTCA GCTCCCTACTG  
Ala Tyr Ala Val Ser His

FIGURE 5 (suite)

2630

TTGCAACGGC CGTGTGGAAA TAAGAAGGGA ATAATAATAA TTATTATTAT TGTAAATAAA AATAATTATC ATATATTGAT

2710

AATGATTATA TATCAAATat cttttctcgat ttcgtcgta cacacgtcac atgagtcacat ggtgcacgcc ttcgtcgac

2790

ccacgaccag acaa:tttag ctgacgtccc gtttagactc attagaattt aatttcattc taataatagt aatttaggca

2870

tatattaact aagataattc gatttatac aaaataatc agtataattat tattagtaag atgtcgaaga tattttatgtg

2950

ctacatttt actatagagg agtgagacga aaagtgtcat gtaagttata tagaagaaac aaatttctact catgcataaa

2991

atcatttctc atccccacc ccatgaattt gagataagct t

FIGURE 5 (suite)

cDNA phy S11 Classe I Classe II	MDSEGV-AAKVADETTKPVASQEDG-ESKAGMTDLMETDKSQLQALAMEL MDSEGV-AAKVADETTKPVASQEDG-ESKAGMTDLMETDKSQLQALAMEL MDSEGVVAAKVADETTKPAIQEDGAESKAGMTDLMETDKSQLQALAMEL *****
cDNA phy S11 Classe I Classe II	RNNEELMMSQAIKSETERVEYLKTVSDCYTRTMKLLDOSMAARITYERSG RNNEELMMSQAIKSETERVEYLKTVSDCYTRTMKLLDOSMAARITYERSG RNNEELMMSQAIKSETERIEYLKTVSDCYTRTMKLLDOSMAARTTYERSG *****
cDNA phy S11 Classe I Classe II	GTRSLVARDMDDYVVYGLNACLQNVRCVRLDAIDKLRAHYDALADAVA GTRSLVARDMDDYVVYGLNACLQNVRCVRLDAIDKLRAHYDALADAVA GTRSLVARDMDDYVVYGLNACLQNVRCVRLDAIDKLRAHYDALADAVA *****
cDNA phy S11 Classe I Classe II	EPAANVEGLAAEASEYKAAMWQYCYNQRSA SARAH S R A Y S Q A L K L E G I D F EPAANVEGLAAEASEYKAAMWQYCYNQRSA SARAH S R A Y S Q A L K L E G I D F DPAANVEGLAAEASEYKAAMWQYCYNQRSA SARAH S R A Y S Q A L K L E G I D F *****
cDNA phy S11 Classe I Classe II	AELVRRHQRLRGYGSKGEEFEDLDDTQKLEVYNSIIVESGRAGLPVRMFS AELVRRHQRLRGYGSKGEEFEDLDDTQKLEVYNSIIVESGRAGLPVRMFS AELVRRHQRLRGYGSKGEEFEDLDDTQKLEVYNSIIVESGRAGLPVRMFS *****
cDNA phy S11 Classe I Classe II	SGRSAGCPKIAATTWAQAVSVFIMAAGNLA W D V F T T E H E V E A I L K G S L N L SGRSAGCPKIAATTWAQAVSVFIMAAGNLA W D V F T T E H E V E A I L K G S L N L SGRSAGCPKIAATTWA E A V S V FIMAAGNLA W D V F T T E H E V E A I L K G S L N L *****
cDNA phy S11 Classe I Classe II	LAGLGGFAVEAVVGAAVTKAVANVAA G V F A C S L A G F V V G A I A C L I F V G V S LAGLGGFAVEAVVGAAVTKAVANVAGV F A C S L A G F V V G A I A C L I F I G V S LAGLGGFAVEAVVGAAVTKAVANVAGV F A C S L A G F V V G A I A C L I F V G V S *****
cDNA phy S11 Classe I Classe II	CLLNLIIIGSPRKVPDMSKLMFHTAVNP D G M A L A Y A V S H CLLNLIIIGSPRKVPDMSKLMFHTAVNP D G M A L A Y A V S H CLLNLIIIGSPRKVPDMSKLMFHTAVNP D G M A L A Y A V S H *****

FIGURE 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01443

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C12N15/55 C12N15/82 A01H5/00 A23K1/165 C08B30/00  
C12P19/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H A23K C08B C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	<p>SHEN, B., ET AL.: "6c01c10-t7 etiolated seedling Zea mays cDNA clone 6c01c10" EMBL SEQUENCE DATABASE, REL. 40, 10-JUN-1994, ACCESSION NO. T20338, XP002030178 cited in the application * the sequence *</p> <p>---</p>	1.4, 6-10,13, 15,16
X	<p>WO 93 09237 A (SANDOZ AG ;SANDOZ AG (DE); SANDOZ LTD (CH)) 13 May 1993 see page 30 - page 36</p> <p>---</p> <p style="text-align: right;">-/-</p>	2

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

11 December 1997

05/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01443

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	GROTEWALD, E., ET AL.: "Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavonone isomerase" MOL. GEN. GENET., vol. 242, pages 1-8, XP002049933 see figure 1 ---	3
X	GELLATLY, K.S., ET AL.: "Isolation and characterization of an acid phosphatase cDNA clone from potato tubers" PLANT PHYSIOLOGY SUPPLEMENT, vol. 93, no. 1, May 1990, page 96 XP002030179 cited in the application * abstract 562 *	6, 9, 13, 15, 16, 39-41, 43
A	---	26-38, 42, 46, 47
X	EHRLICH K C ET AL: "CLONING AND SEQUENCING OF THE PHYTASE GENE FROM SOYBEAN." ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, PITTSBURGH, PENNSYLVANIA, USA, AUGUST 1-5, 1992. PLANT PHYSIOL (BETHESDA) 99 (1 SUPPL.). 1992. 87., XP002030180 cited in the application * abstract 515 *	6, 9, 13, 15, 16
A	---	26-37
X	EP 0 449 375 A (GIST BROCADES NV ;MOGEN INT (NL)) 2 October 1991 cited in the application see page 2, line 53 - line 58 see page 4, li.. 30 - line 31 see page 5, line 7 - line 22 see page 7, line 26 - line 47; claims 1-21 ---	26-40, 42-44, 46, 47
Y	WO 95 06128 A (DEKALB GENETICS CORP) 2 March 1995 see page 47, line 10 - line 25; claim 21 ---	33-36
Y	WO 95 06128 A (DEKALB GENETICS CORP) 2 March 1995 see page 47, line 10 - line 25; claim 21 ---	33-36
X	LABOURE, A.-M., ET AL.: "Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (Zea mays) seedlings during germination" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 295, no. 2, 15 October 1993, pages 413-419, XP000673228 cited in the application see the whole document ---	40, 41, 43, 44
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No

PCT/FR 97/01443

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P, X	MAUGENEST S ET AL: "Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase." BIOCHEMICAL JOURNAL 322 (2). 1997. 511-517., XP000673229 see the whole document ---	1-17, 26, 38-41, 43
A	VERWOERD, T. C. ET AL: "Stable accumulation of Aspergillus niger phytase in transgenic tobacco leaves" PLANT PHYSIOLOGY, (1995) VOL. 109, NO. 4, PP. 1199-1205., XP002030181 cited in the application see the whole document ---	26-39
A	PEN J ET AL: "Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed-additive for improved phosphorus utilization" BIO/TECHNOLOGY;(1993) 11, 7, 811-14, XP002026203 cited in the application see the whole document ---	26-37, 42-44, 47, 48
A	EP 0 420 358 A (GIST BROCADES NV) 3 April 1991 see claims 22-24 ---	38
A	WO 95 14099 A (UNIV CALIFORNIA ;RODRIGUEZ RAYMOND L (US)) 26 May 1995 see claim 20 ---	38
A	CHEMICAL ABSTRACTS. vol. 125, no. 7. 12 August 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 77808, LI, JIA: "Secretion of active recombinant phytase from stably transformed soybean cells(phosphorous, glycine max, aspergillus niger)" XP002030183 see abstract & (1995) 140 PP. AVAIL.: UNIV. MICROFILMS INT., ORDER NO. DA9618981 FROM: DISS. ABSTR. INT., B 1996, 57(2), 893, ---	38
A	EP 0 321 004 A (DORR OLIVER INC ;ALKO LTD (FI)) 21 June 1989 see claim 6 ---	36, 37
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH

International Application No  
PCT/FR 97/01443

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of

Relevant to claim No

A CARANSA, A., ET AL.: "A novel application for corn wet mill STARCH, vol. 40, 1988, pages 409-411, XP002030182 \* page 411, right col., "co  
---

36.37

A WO 93 12668 A (ABBOTT LAB) 8  
see page 11, paragraph 3  
see page 36, last paragraph  
-----

47.48

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9309237 A	13-05-93	AU 670417 B AU 2920392 A EP 0611395 A HU 66207 A JP 7500965 T ZA 9208538 A	18-07-96 07-06-93 24-08-94 28-10-94 02-02-95 05-05-94
EP 0449375 A	02-10-91	AU 649447 B AU 7765691 A AU 632941 B AU 7776691 A CA 2056396 A EP 0449376 A IL 97645 A JP 6501838 T JP 6502296 T WO 9114782 A WO 9114772 A US 5543576 A US 5593963 A	26-05-94 21-10-91 14-01-93 21-10-91 24-09-91 02-10-91 18-03-97 03-03-94 17-03-94 03-10-91 03-10-91 06-08-96 14-01-97
WO 9506128 A	02-03-95	AU 7716994 A CA 2170260 A EP 0721509 A HU 74392 A ZA 9406488 A	21-03-95 02-03-95 17-07-96 30-12-96 30-11-95
EP 0420358 A	03-04-91	AU 636673 B AU 6501190 A BG 60108 A CA 2042054 A CN 1051058 A DE 420358 T EP 0779037 A ES 2072834 T JP 4506007 T LT 1527 A, B LV 10310 A LV 10310 B WO 9105053 A	06-05-93 28-04-91 15-10-93 28-03-91 01-05-91 12-10-95 18-06-97 01-08-95 22-10-92 26-06-95 20-10-94 20-10-95 18-04-91

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0420358 A		PL 167790 B PL 168470 B US 5436156 A	30-11-95 29-02-96 25-07-95
WO 9514099 A	26-05-95	AU 1289295 A CA 2176834 A EP 0788550 A	06-06-95 26-05-95 13-08-97
EP 0321004 A	21-06-89	NL 8702735 A CA 1296668 A CN 1033925 A,B DE 3868032 A FI 93919 B JP 1281048 A JP 2589560 B MX 26691 A,B SU 1829959 A US 4914029 A	16-06-89 03-03-92 19-07-89 05-03-92 15-03-95 13-11-89 12-03-97 01-06-93 23-07-93 03-04-90
WO 9312668 A	08-07-93	US 5248765 A AU 3329593 A CA 2121034 A EP 0617580 A MX 9207012 A US 5306810 A ZA 9208833 A	28-09-93 28-07-93 08-07-93 05-10-94 30-06-94 26-04-94 13-05-93

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 97/01443

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 C1B 6 C12N15/55 C12N15/82 A01H5/00 A23K1/165 C08B30/00  
 C12P19/04

Selon la classification internationale des brevets (C1B) ou à la fois selon la classification nationale et la C1B

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C1B 6 C12N A01H A23K C08B C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SHEN, B., ET AL.: "6c01c10-t7 etiolated seedling Zea mays cDNA clone 6c01c10" EMBL SEQUENCE DATABASE, REL. 40, 10-JUN-1994, ACCESSION NO. T20338, XP002030178</p> <p>cité dans la demande</p> <p>* la séquence *</p> <p>---</p>	1,4, 6-10,13, 15,16
X	<p>WO 93 09237 A (SANDOZ AG ;SANDOZ AG (DE); SANDOZ LTD (CH)) 13 mai 1993</p> <p>voir page 30 - page 36</p> <p>---</p> <p>---</p>	2

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
11 décembre 1997	05/01/1998
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HT Rijswijk Tel : +31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eoo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Maddox, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 97/01443

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
X	GROTEWALD, E., ET AL.: "Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavonone isomerase" MOL. GEN. GENET., vol. 242, pages 1-8. XP002049933 voir figure 1 ---	3
X	GELLATLY, K.S., ET AL.: "Isolation and characterization of an acid phosphatase cDNA clone from potato tubers" PLANT PHYSIOLOGY SUPPLEMENT, vol. 93, no. 1, mai 1990, page 96 XP002030179 cité dans la demande * abrégé 562 *	6, 9, 13, 15, 16, 39-41, 43
A	---	26-38, 42, 46, 47
X	EHRLICH K C ET AL: "CLONING AND SEQUENCING OF THE PHYTASE GENE FROM SOYBEAN." ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, PITTSBURGH, PENNSYLVANIA, USA, AUGUST 1-5, 1992. PLANT PHYSIOL (BETHESDA) 99 (1 SUPPL.). 1992. 87.. XP002030180 cité dans la demande * abrégé 515 *	6, 9, 13, 15, 16
A	---	26-37
X	EP 0 449 375 A (GIST BROCADES NV ; MOGEN INT (NL)) 2 octobre 1991 cité dans la demande voir page 2, ligne 53 - ligne 58 voir page 4, ligne 30 - ligne 31 voir page 5, ligne 7 - ligne 22 voir page 7, ligne 26 - ligne 47; revendications 1-21 ---	26-40, 42-44, 46, 47
Y	WO 95 06128 A (DEKALB GENETICS CORP) 2 mars 1995 voir page 47, ligne 10 - ligne 25; revendication 21 ---	33-36
X	LABOURE, A.-M., ET AL.: "Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (Zea mays) seedlings during germination" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 295, no. 2, 15 octobre 1993, pages 413-419, XP000673228 cité dans la demande voir le document en entier ---	40, 41, 43, 44
		-/-

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Dem. de Internationale No :

PCT/FR 97/01443

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	MAUGENEST S ET AL: "Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase" BIOCHEMICAL JOURNAL 322 (2). 1997. 511-517., XP000673229 voir le document en entier ---	1-17, 26, 38-41, 43
A	VERWOERD, T. C. ET AL: "Stable accumulation of Aspergillus niger phytase in transgenic tobacco leaves" PLANT PHYSIOLOGY, (1995) VOL. 109, NO. 4, PP. 1199-1205., XP002030181 cité dans la demande voir le document en entier ---	26-39
A	PEN J ET AL: "Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed-additive for improved phosphorus utilization" BIO/TECHNOLOGY;(1993) 11, 7, 811-14, XP002026203 cité dans la demande voir le document en entier ---	26-37, 42-44, 47, 48
A	EP 0 420 358 A (GIST BROCADES NV) 3 avril 1991 voir revendications 22-24 ---	38
A	WO 95 14099 A (UNIV CALIFORNIA ;RODRIGUEZ RAYMOND L (US)) 26 mai 1995 voir revendication 20 ---	38
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 125, no. 7, 12 août 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 77808, LI, JIA: "Secretion of active recombinant phytase from stably transformed soybean cells(phosphorous, glycine max, aspergillus niger)" XP002030183 voir abrégé & (1995) 140 PP. AVAIL.: UNIV. MICROFILMS INT.. ORDER NO. DA9618981 FROM: DISS. ABSTR. INT., 8 1996, 57(2), 893, ---	38
A	EP 0 321 004 A (DORR OLIVER INC ;ALKO LTD (FI)) 21 juin 1989 voir revendication 6 ---	36, 37
		-/-

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°  
PCT/FR 97/01443

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CARANSA, A., ET AL.: "A novel enzyme application for corn wet milling" STARCH, vol. 40, 1988, pages 409-411. XP002030182 * page 411, col. droite, "conclusions" * ---	36, 37
A	WO 93 12668 A (ABBOTT LAB) 8 juillet 1993 voir page 11, alinéa 3 voir page 36, dernier alinéa -----	47, 48

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 97/01443

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9309237 A	13-05-93	AU 670417 B AU 2920392 A EP 0611395 A HU 66207 A JP 7500965 T ZA 9208538 A	18-07-96 07-06-93 24-08-94 28-10-94 02-02-95 05-05-94
EP 0449375 A	02-10-91	AU 649447 B AU 7765691 A AU 632941 B AU 7776691 A CA 2056396 A EP 0449376 A IL 97645 A JP 6501838 T JP 6502296 T WO 9114782 A WO 9114772 A US 5543576 A US 5593963 A	26-05-94 21-10-91 14-01-93 21-10-91 24-09-91 02-10-91 18-03-97 03-03-94 17-03-94 03-10-91 03-10-91 06-08-96 14-01-97
WO 9506128 A	02-03-95	AU 7716994 A CA 2170260 A EP 0721509 A HU 74392 A ZA 9406488 A	21-03-95 02-03-95 17-07-96 30-12-96 30-11-95
EP 0420358 A	03-04-91	AU 636673 B AU 6501190 A BG 60108 A CA 2042054 A CN 1051058 A DE 420358 T EP 0779037 A ES 2072834 T JP 4506007 T LT 1527 A, B LV 10310 A LV 10310 B WO 9105053 A	06-05-93 28-04-91 15-10-93 28-03-91 01-05-91 12-10-95 18-06-97 01-08-95 22-10-92 26-06-95 20-10-94 20-10-95 18-04-91

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR 97/01443

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0420358 A		PL 167790 B PL 168470 B US 5436156 A	30-11-95 29-02-96 25-07-95
WO 9514099 A	26-05-95	AU 1289295 A CA 2176834 A EP 0788550 A	06-06-95 26-05-95 13-08-97
EP 0321004 A	21-06-89	NL 8702735 A CA 1296668 A CN 1033925 A, B DE 3868032 A FI 93919 B JP 1281048 A JP 2589560 B MX 26691 A, B SU 1829959 A US 4914029 A	16-06-89 03-03-92 19-07-89 05-03-92 15-03-95 13-11-89 12-03-97 01-06-93 23-07-93 03-04-90
WO 9312668 A	08-07-93	US 5248765 A AU 3329593 A CA 2121034 A EP 0617580 A MX 9207012 A US 5306810 A ZA 9208833 A	28-09-93 28-07-93 08-07-93 05-10-94 30-06-94 26-04-94 13-05-93